

十二指腸空腸バイパス術におけるalimentary limb、bilio-pancreatic limbの機能:2型糖尿病モデルラットでの検討

著者	宮地 智洋
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第16280号
URL	http://hdl.handle.net/10097/61041

博士論文

十二指腸空腸バイパス術における
alimentary limb、bilio-pancreatic limb の機能
：2 型糖尿病モデルラットでの検討

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

外科病態学講座生体調節外科学分野

宮地 智洋

目次

1		
2		
3	I 要旨	p. 3
4	II 背景と目的	p. 5
5	III 対象と方法	p. 8
6	IV 結果	p. 16
7	V 考察	p. 20
8	VI 結語	p. 28
9	VII 謝辞	p. 29
10	VIII 参考文献	p. 30
11	IX 図の説明	p. 37
12	X 図	p. 44
	XI 表	p. 65

1 I. 要旨

2 **【背景と目的】**十二指腸空腸バイパス(duodenal-jejunal bypass; DJB)は糖尿病モデルラ
3 ットにおいて耐糖能改善効果を有することが報告されているが、その機序の全容は解
4 明されておらず、特に食物のみが通過する alimentary limb(A-limb)と胆汁胰液のみが通
5 過する bilio-pancreatic limb(BP-limb)が果たす機能については未だ不明な点が多く残さ
6 れている。今回、糖尿病モデルラットを用いて DJB におけるこれら limb の機能につ
7 いて検証した。**【方法】**過食から肥満、糖尿病を発症する Otsuka Long-Evans Tokushima
8 fatty ラットを使用した。①A-limb を長く BP-limb を短く設定した **A-DJB 群**、②A-limb
9 を短く BP-limb を長く設定した **B-DJB 群**、③A-DJB 群の A-limb のほぼ全長、または
10 B-DJB 群の BP-limb 全長に相当する部位の空腸を切除した上で A-limb、BP-limb を短
11 く設定した DJB を行った **J-DJB 群**および④**sham 群**の4群に分け、手術を行った。糖
12 代謝、胆汁酸の血漿中濃度、胆汁酸吸収・合成に關与する遺伝子発現の変化、腸内細
13 菌叢などを解析し、J-DJB 群と A-DJB 群、B-DJB 群を比較することで A-limb および
14 BP-limb のそれぞれの作用について検証した。**【結果】**B-DJB 群は耐糖能が最も改善
15 し、術後の体重増加も sham 群に比べ有意に抑制された。A-DJB 群でも耐糖能の改善
16 がみられたが、体重増加抑制はみられず、J-DJB 群では耐糖能の改善も体重増加抑制
17 もみられなかった。血漿胆汁酸濃度は B-DJB 群が sham 群に比べ有意に高値を示し、
18 B-DJB 群では遠位空腸で、上皮細胞内の胆汁酸輸送担体である fatty acid binding protein
19 6 と胆汁酸が発現刺激となる fibroblast growth factor 15 遺伝子の発現が sham 群に比べ

1 有意に亢進していた。胆汁酸合成に関与する遺伝子発現には有意差がみられなかった。

2 腸内細菌叢解析では B-DJB 群に細菌叢構成に変化がみられた。【考察】2 型糖尿病モ

3 デルラットに対する DJB において、A-limb は体重増加抑制を伴わない耐糖能改善効

4 果、BP-limb は体重増加抑制作用とより大きな耐糖能改善作用を有し、また BP-limb

5 の作用にはエネルギー代謝改善作用を有する胆汁酸の血漿中濃度の上昇が関与して

6 いると考えられた。B-DJB 群で遠位空腸での遺伝子発現の変化を認め、同部での胆汁

7 酸吸収が変化している可能性が示唆されたが、血漿胆汁酸濃度上昇の機序の詳細は解

8 明できなかった。腸内細菌叢にも変化がみられ、宿主のエネルギー代謝などに影響し

9 ている可能性が考えられた。BP-limb の術後体重増加、耐糖能、血漿胆汁酸に対する

10 作用は新規の知見であり減量手術の機序解明に資するものと考えられる。【結語】2

11 型糖尿病モデルラットに対する DJB において BP-limb が重要な機能を果たしており、

12 その機序に血漿胆汁酸が関与していると考えられた。

1 II. 背景と目的

2 現在、減量手術は肥満患者にとって、長期的な減量効果、糖尿病とその合併症の発
3 症予防や改善、さらには全死亡率の減少を期待できる最も有効な治療法とされ、欧米
4 諸国を中心に、年間 30 万件以上の手術が世界中でなされている¹⁻⁴。糖代謝の改善は
5 術後体重減少がみられるより早期に現れ、減量によらない代謝改善メカニズムが背景
6 に存在していると考えられ、この機序を解明し、さらには内科的治療への応用の可能
7 性を探るためにこれまで多くの研究がなされている。これら手術の代謝改善の機序と
8 して、当初は glucagon-like peptide-1 (GLP-1) や glucose-dependent insulinitropic
9 polypeptide (GIP)、peptide YY (PYY)などの消化管ホルモン分泌の変化が注目され、近
10 年は血中胆汁酸濃度の上昇や回腸上皮細胞から分泌される fibroblast growth factor 19
11 (FGF19)、腸内細菌叢などの関与が指摘されるようになってきたが、いまだその全容
12 は明らかではない⁵⁻⁷。

13 Roux-en-Y 胃バイパス術(Roux-en-Y gastric bypass; RYGB)や十二指腸空腸バイパス
14 術(duodenal-jejunal bypass; DJB)という消化管をバイパスする術式において、改善機序
15 とされる前述の項目の多くは common channel での現象に主眼が置かれており、
16 common channel としての回腸に、未吸収の食物や、乳化に携わっていない胆汁が流入
17 することで回腸上皮からの GLP-1、PYY や FGF19 の分泌や胆汁酸の吸収が亢進する
18 という報告、仮説が多くなされている(図 1)⁵⁻⁷。一方、alimentary limb (A-limb)と
19 bilio-pancreatic limb (BP-limb)の糖脂質代謝に対する直接的な影響についての検証は充

1 分になされているとはいえない。また、A-limb, BP-limb の長さが糖脂質代謝に対しど
2 のように影響するかについては、これまで臨床症例をまとめた報告が複数あるが、肥
3 満患者の小腸の長さの個体差が大きいことや、術中に測定する腸管の長さの正確性の
4 問題などから、エビデンスレベルの高い報告はない⁸。

5 当教室では以前に A-limb の長さを複数設定した動物の DJB モデルを作成し、A-limb
6 を長く、common channel を短く設定したほうが糖尿病改善効果が高くなることを確認
7 し報告している⁹。また、今回の研究の準備実験では BP-limb を長く設定すると術後
8 の体重増加抑制、糖代謝改善効果が大きくなることを確認しており¹⁰、BP-limb 自体
9 も重要な作用を有していることが推測され、A-limb および BP-limb の機能や術後の代
10 謝に与える影響は詳細に検証されるべきである。また、これらの解明は臨床において
11 減量手術施行時の limb の長さを設定する際の科学的根拠となりうると考えられる。

12 代謝改善機序の一つにあげられている胆汁酸は、近年、metabolic modulator として
13 の作用に注目が集まっている。G-protein-coupled bile acid receptor (TGR5)や核内受容体
14 である farnesoid X receptor (FXR)リガンドとして働き、骨格筋や褐色脂肪組織におけ
15 るエネルギー代謝を亢進し、肝臓では脂質新生、糖新生に関与し、インスリン感受性
16 も改善する¹¹⁻¹⁵。この他にも、親水性胆汁酸は肝小胞体ストレス減弱に伴うインスリ
17 ン抵抗性改善作用を有するとされている¹⁶。

18 減量手術の代表的術式である RYGB、胃袖状切除術(vertical sleeve gastrectomy; VSG)
19 や回腸置換術(ileal transposition; IT)で血中胆汁酸濃度の上昇することや組成が変化す

1 ることがヒトおよび動物で確認されており¹⁷⁻¹⁹、また FXR ノックアウトマウスでは
2 VSG 後の体重増加抑制効果、糖代謝改善効果が消失したという報告もあり²⁰、近年、
3 減量手術の代謝改善効果における胆汁酸シグナルの重要性が明らかとなってきた
4 る(図 1a)。しかし胆汁酸の血中濃度や組成が術後に変化する機序については不明な点
5 が多く、また DJB が血中胆汁酸にどのような影響を与えるかについてはいまだ報告
6 がない。これらを解明することは減量手術における胆汁酸シーケンスの全体像、ひ
7 いては減量手術のメカニズム解明にもつながる重要な課題である。

8 DJB において A-limb および BP-limb が術後体重変化や糖脂質代謝、胆汁酸ホメオ
9 スタシスなどにおよぼす影響およびその機序を検証することを目的として本研究を
10 行った。

1 III. 対象と方法

2 本研究の実験プロトコールは全て動物実験計画書の審査により東北大学動物実験
3 専門委員会の承認を得た上で行った(図 2a)。

4 1. 実験動物

5 雄性の Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) ラットを使用した。OLETF ラ
6 ットはコレシストキニン A 受容体を欠損しており、過食から肥満および高インスリン
7 血漿をとまなう高血糖を呈し、2 型糖尿病やメタボリックシンドロームのモデル動物
8 として使用されている^{9, 21-24}。4~6 週齢で日本 SLC(静岡)より購入し、SPF 環境での単
9 飼育とし、通常飼料 (ラボ MR ストック ; 脂質 15.2%kcal、タンパク質 32.6%kcal、炭
10 水化物 52.3%kcal(日本農産工業; 神奈川))を給餌した。19 週齢で食事負荷試験を行い、
11 負荷後血糖値が 200mg/dl 以上に上昇しないラットは除外した。

12 2. 手術デザインおよび周術期管理

13 手術は 20 週齢で行った。今回の研究の準備実験として OLETF ラットを用いて
14 A-limb と BP-limb のそれぞれの長さを 3cm または 30cm で設定した DJB モデル 4 群を
15 作成し、術後体重変化、食事負荷試験時の血糖値を評価した。Limb の長さ 3cm は手
16 術を行う上で可能な限り短くできる A-limb の長さであること、30cm は小腸全長の約
17 3 分の 1 として設定し、A-limb 30cm・BP-limb 3cm と設定した群を A-limb の効果を検
18 証するモデル、A-limb 3cm・BP-limb 30cm と設定した群は BP-limb の効果を検証する
19 モデルと考えた。その結果、A-limb 30cm・BP-limb 3cm と設定した群で血糖値が低値

1 となり、BP-limb を 30cm と設定した 2 群で術後体重増加が有意に抑制され、血糖値
2 もより低値となった(図 3)。このことから A-limb に糖代謝を改善する作用が、BP-limb
3 には体重増加抑制を伴うより強い糖代謝改善作用が存在する可能性があると考え、今
4 回の研究の手術モデルは common channel の長さを一定にして各 limb の機能を検証す
5 るため以下のように設定した。

6 OLETF ラットを以下の 4 群;①A-limb を長く、BP-limb を可及的短く設定した **A-DJB**
7 群(A-limb 30cm、BP-limb 3cm)、②A-limb を短く BP-limb を長く設定した **B-DJB** 群
8 (A-limb 3cm、BP-limb 30cm)、③B-DJB 群の BP-limb に相当する近位空腸 30cm を切除
9 し、A-limb と BP-limb とともに短く設定した **J-DJB** 群(A-limb 3cm、BP-limb 0cm)および
10 ④**sham** 群(sham 手術群)、に分け各群 6 頭を割り当てた(図 2b)。全身麻酔は塩酸メデ
11 トミジン(0.15mg/kg)、ミダゾラム(2mg/kg)、酒石酸ブトルファノール(2.5mg/kg)の混合
12 麻酔薬の腹腔内投与で行い、手術を既報に準じて行った⁹。上腹部正中 4cm の切開で
13 開腹し、A-DJB 群、B-DJB 群では幽門近傍で十二指腸を切離、十二指腸の肛門側断端
14 を縫合閉鎖した後、Treitz 靱帯より 3cm または 30 cm の位置で切離、その肛門側断端
15 と十二指腸口側断端とを端々吻合し、さらに空腸肛門側断端を十二指腸空腸吻合部よ
16 り 30 cm または 3cm 肛門側の位置に端側で吻合する。J-DJB 群では Treitz 靱帯から
17 30cm にわたる空腸を切除した後に、空腸断端を十二指腸口側断端と端々吻合し、そ
18 の 3cm 肛門側の位置で十二指腸末端部(断端)と端側吻合を行った。Sham 群では、幽
19 門近傍の十二指腸を切離後に再吻合し、また Treitz 靱帯から 3cm の部位の空腸も同

様に切離再吻合を行った。吻合は全て 5-0 吸収糸ポリソーブ(アルフレッサファーマ ; 大阪)を用いて全層連続縫合で行った。手術終了時、生理食塩水 8ml と抗生剤フロモキシセフナトリウム溶液 10mg/1ml を皮下投与した。J-DJB 群は B-DJB 群の BP-limb 全てを切除したモデルとみなせ、B-DJB 群と J-DJB 群を比較することで A-limb および BP-limb の機能を推測することができる。本研究において BP-limb を、既報と同様に Treitz 靱帯を始点として空腸空腸吻合、つまり common channel までの小腸と定義している⁹。胆汁膵液のみが通過する腸管としては Vater 乳頭部以遠の十二指腸も含まれ、前述の BP-limb に当該の十二指腸長約 5cm を加算した値がその腸管長となる。

飲水は術直後から再開し、手術翌日昼より通常の給餌を再開した。

3. 食事、ピルビン酸、インスリン負荷試験

食事負荷試験、ピルビン酸負荷試験、インスリン負荷試験をそれぞれ術後 8、10、11 週に施行した。食事負荷試験の施行時期については、本研究と同様に OLETF ラットを用いて十二指腸空腸バイパスの効果、機序を検証した既報で術後 8 週齢ブドウ糖負荷試験を行い、耐糖能改善効果が認められており、この既報を参考に本研究でも術後 8 週から各種負荷試験を実施した⁹。すべての負荷試験は前日夕より絶食として行った。食事負荷試験は既報に準じて²⁵、エンシュア H バニラ味 (1.5kcal/ml、脂質 28%kcal、タンパク質 15%kcal、炭水化物 57%kcal (アボットジャパン ; 東京))を 1.2gCHO/5.8ml/8.76kcal/kg の割合で投与し、負荷前、負荷後 15、30、60、120 分に尾静脈より採血した。採取した血液はエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を添加したチュ

1 ープに採取し遠心分離した後、血漿を-80℃ で冷凍保存した。血糖値は自動血糖値測
2 定器 Ascensia Breeze 2 (Bayer ; Frankfurt, Germany)にて測定した。ピルビン酸負荷試
3 験ではピルビン酸ナトリウム 2g/kg を皮下投与し、投与前後の血糖値の変化を経時的
4 に測定した。インスリン負荷試験ではインスリン 0.5U/kg body を腹腔内投与した。

5 4. 犠死時血漿および組織サンプル採取

6 術後 12 週で犠死せしめた。前日夕から絶食とし、エンシュア H バニラ味を食事負
7 荷試験と同等量を経口投与し、投与後 60 分でサンプル採取を行った。 DJB の本質は
8 栄養素および消化液の通過ルートを変更することにあると考え、術後の各種ホルモン
9 分泌や関連する遺伝子発現の変化は食事負荷後により大きくなり各種解析で検出し
10 やすくなると推測し、本研究ではサンプル採取のタイミングを食事負荷後と設定した。
11 下大静脈血を EDTA および GLP-1 分解酵素阻害剤である dipeptidyl peptidase-IV
12 (DPP-IV) inhibitor を添加したチューブに採取し、遠心分離した後、血漿を-80℃で冷凍
13 保存した。定量ポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction; PCR)用に小腸は、①
14 手術前の状態で、つまり解剖学的に Treitz 靱帯から 20cm の部位に相当する空腸
15 (A-DJB 群では A-limb に、B-DJB 群では BP-limb に相当する。J-DJB 群では同部位の
16 腸管は手術時に切除されている。)、②同じく Treitz 靱帯から 35cm の部位に相当する
17 空腸(DJB を施行した群では common channel 起始部近傍に相当する。)および③回腸末
18 端から 5cm 口側の回腸の 3 ヶ所を採取した。小腸および肝臓は細切し、細胞内 RNA
19 を安定保存するために RNA Later (Ambion ; Austin, TX)内で 24 時間以上 4℃で冷蔵保

1 存後、-80°Cで凍結保存した。

2 5. 血漿総胆汁酸、各種ホルモン、トリグリセリド、アルブミン、アラニンアミ

3 ノ基転移酵素(ALT)、総ビリルビン測定

4 術後 8 週に実施した食事負荷試験時に採取した血漿中の総胆汁酸濃度を総胆汁酸-

5 テストワコー(和光純薬工業；大阪)を用いて酵素法で測定した。犠死時に採取した血

6 漿中のインスリン、グルカゴン、活性型 GLP-1、PYY および FGF15 濃度は、それぞ

7 れを森永生化学研究所(神奈川)、矢内原研究所(静岡)、Millipore(Bedford, MA)、矢内

8 原研究所、Cloud-Clone(Houston, TX)製のキット用いて電気化学発光法で測定した。

9 げっ歯類の FGF15 はヒトの FGF19 と相同するホルモンであり、回腸上皮から分泌さ

10 れ、インスリン非依存性の糖代謝能改善効果を有する^{6, 26, 27}。また血漿中トリグリセ

11 リド、アルブミン、ALT、総ビリルビン濃度をスポットケム II (アークレイ；京都)に

12 て測定した。

13 6. 肝臓トリグリセリド含有量測定

14 肝臓中のトリグリセリドは Folch らのクロロホルム-メタノール法により抽出し²⁸、

15 トリグリセライド E-テストワコー (和光純薬工業)にて測定した。

16 7. 血漿メタボローム解析

17 犠死時に採取した血漿中の代謝産物を網羅的に解析した。既報と同様に Agilent

18 CE-TOFMS system と Agilent 1200 series RRLC system SL (アジレントテクノロジー；

19 東京)を用いて capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS)法お

よび liquid chromatography (LC)-TOFMS 法にて各代謝産物を相対定量した²⁹。本検査は Human Metabolome Technologies(山形)に委託し行った。

8. 定量 PCR

小腸での胆汁酸吸収の変化を検証するため、sodium-dependent bile salt transporter (ASBT)および organic solute transporter (OST) α 、fatty acid binding protein 6 (FABP6)、FGF15 の4遺伝子の発現を定量 PCR で解析した。これら遺伝子は主に回腸で発現しており、ASBT および OST α β ヘテロ二量体はそれぞれ上皮細胞の管腔側、基底膜側に存在する胆汁酸の膜輸送担体であり、FABP6は細胞内の胆汁酸輸送担体である^{30,31}。FGF15 は胆汁酸吸収には関与しないが、胆汁酸による FXR 刺激でその発現が亢進される^{6,27}。また、肝臓での胆汁酸合成に関与する cytochrome P450 7A1(CYP7A1)、核内受容体である FXR および small heterodimer partner (SHP)の遺伝子発現も解析した。CYP7A1 は胆汁酸合成の代表的な律速酵素であり、FXR は SHP を介して CYP7A1 の遺伝子発現を抑制する作用をもつ³²。

RNA 抽出キット(RNeasy Plus Universal Mini Kit, QIAGEN ; Hilden、Germany)を用いて小腸および肝臓組織から totalRNA を抽出し、SuperScript III Reverse Transcriptase 、oligo-dT primers (Invitrogen; Carlsbad、CA)を用いて cDNA を合成した。SYBR Green PCR Kit (Applied Biosystems ; Foster City、CA)を用いて cDNA を増幅し、real-time PCR による mRNA 発現の定量は Step One Plus system (Applied Biosystems)を用いて行った。内在性コントロールを cyclophilin A とし、発現量の比を示した。使用したプライマー

1 配列は表 1 に記載した。

2 9. Terminal restriction fragment length polymorphism 法による腸内細菌叢解析

3 犠死時に回腸末端部の腸管内容を採取し、-30°Cで凍結保存、S 状結腸からも糞便を

4 採取し、こちらは 99%エタノール内に-30°Cで保存した。ビーズ式破碎装置を用いて、

5 細菌 DNA を Fast DNA Spin Kit For Soil (MP Biomedicals ; Santa Ana, CA)にて分離精製

6 した。腸内細菌叢の terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 法によ

7 る解析は既報のごとく行った³³。プライマー (27F:

8 5'-FAM-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' および 1492R:

9 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') を使用し、16S rDNA を PCR 法にて増幅した。プ

10 ライマー27F はあらかじめ 6-carboxyfluorescein (FAM)で蛍光標識し、反応溶液の調整

11 には ExTaq (タカラバイオ ; 滋賀)を使用した。アンプリコンを QIAquick PCR

12 Purification Kit (Qiagen)を用いて精製した後、制限酵素 MspI (タカラバイオ ; 滋賀)に

13 て消化し、消化後断片を MinElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen 社)を用いて精製した。

14 GS1200LIZ (Life Technologies ; Palo Alto, CA)をサイズスタンダードとして、末端制限

15 酵素処理断片の長さを ABI PRISM 3130xl genetic analyzer (Life Technologies)を用いて

16 測定、解析した。細菌叢の主成分分析には JMP10.0.0 statistical software package (SAS ;

17 Cary, NC)を使用した。

18 10. 統計学的解析

19 全てのデータは平均値±標準誤差の形で表記し、p 値 0.05 以下で有意とした。

- 1 Levene test で等分散性を検定したうえで Dunnett's test または Dunnett C test を使用し、
- 2 sham 群とその他の群の数値を比較した。なお、食餌摂取量と消化管長に関しては
- 3 Tukey's test ですべての群間を比較した。JMP10.0.0 statistical software package (SAS)に
- 4 て解析を行った。

1 IV. 結果

2 1. B-DJB 群では術後体重増加が抑制された。

3 術後 2、9 週の時点での摂餌量に群間差はみられなかったが(図 4a), Sham group の術
4 後体重増加が $65.7 \pm 5.8\text{g}$ (平均 \pm 標準誤差)であったのに対し、B-DJB group のみが術後
5 の体重増加が $15.3 \pm 6.3\text{g}$ と有意に抑えられた(図 4b)。犠死、組織採取時に測定した小
6 腸の全長は $91.1 \pm 0.89\text{cm}$ 、DJB を受けた 3 群の common channel の長さは $58.6 \pm$
7 0.98cm (図 5)であり、それぞれ群間差は認めなかった。J-DJB 群は、B-DJB 群の BP-limb
8 に相当する近位空腸 30cm を切除したモデルであり、消化吸収を担当する A-limb およ
9 び common channel の長さは同等であるが、体重増加は $80.5 \pm 6.6\text{g}$ と sham 群と差がみ
10 られなかった。A-limb を長く設定した A-DJB 群でも sham 群と比し、有意差がみられ
11 なかった。

12 2. 食事負荷後の血糖値は A-DJB 群と B-DJB 群で低値となった。

13 術後 8 週の食事負荷試験では、B-DJB 群で血糖値が最も低く推移し、A-DJB 群がそ
14 れに続いた(図 6a)。この 2 群は波形下面積でも sham 群に比し、有意に低値となった(図
15 6b)。J-DJB 群では sham 群と有意差を認めなかった。インスリン感受性を評価するた
16 めに行ったインスリン負荷試験では、負荷後 15 分値から 60 分値まで B-DJB 群が sham
17 群に比し有意に低値で経過し、A-DJB 群と J-DJB 群は 60 分値でのみ有意に低値とな
18 った(図 6c)。また、肝臓の糖新生を評価するためにピルビン酸負荷試験を行ったとこ
19 ろ、B-DJB 群が常に血糖が低値で経過し、A-DJB 群は 45 分値のみ sham 群に比し有意

1 に低値となった。J-DJB 群は低くなる傾向がみられたものの、全ての測定点で有意差
2 はみられなかった(図 6d)。BP-limb がインスリン感受性改善および糖新生抑制効果を
3 有することが推察された。

4 **3. B-DJB 群でトリグリセリドの血漿中濃度および肝臓含有量が低値となった。**

5 トリグリセリド血漿濃度および体重当りの後腹膜脂肪組織重量が A-DJB 群と
6 B-DJB 群で sham 群に比べ低値となり、肝臓のトリグリセリド含有量は B-DJB 群のみ
7 が有意に低値となった(図 7)。一方、J-DJB 群はいずれも sham 群との間に有意差は認
8 めなかった。B-DJB 群は脂質代謝においても、他群より優れた改善効果を有している
9 と考えられた。

10 **4. アルブミン血漿濃度に群間差はみられなかった。**

11 栄養状態を評価する目的で犠死時血漿サンプル中のアルブミン濃度を測定したが、
12 sham 群に比し、差はみられなかった(図 8)。

13 **5. 回腸から分泌される消化管ホルモン血漿濃度に群間差はみられなかった。**

14 犠死時血漿サンプル中の GLP-1、PYY、FGF15 濃度は、いずれも sham 群に比し、
15 有意差がみられなかった(図 9)。インスリン濃度は B-DJB 群で sham 群に比し有意に
16 低値となっており、インスリン感受性の改善を反映しているものと考えられた。なお
17 今回は、食事負荷後 60 分の時点で犠死しており、異なるポイントでサンプルを採取
18 していれば、異なった結果が得られた可能性がある。

19 **5. B-DJB 群で食事負荷後の血漿胆汁酸濃度が高値となった。**

術後8週の食事負荷試験時の血漿総胆汁酸濃度はB-DJB群が高値で経過した(図10)。
また犠死時の血漿サンプルでメタボローム解析を行い、代謝産物の変化を網羅的に検証したところ、各種胆汁酸で大きな変化がみられた。B-DJB群で各種胆汁酸濃度が上昇しており、グリシン抱合コール酸、タウリン抱合コール酸、遊離ケノデオキシコール酸(chenodeoxycholic acid; CDCA)、グリシン抱合CDCA、タウリン抱合CDCA、グリシン抱合デオキシコール酸(deoxycholic acid; DCA)、遊離ウルソデオキシコール酸(ursodeoxycholic acid; UDCA)、タウリン抱合UDCAおよび遊離ヒオデオキシコール酸はsham群に比し、有意差をもって高値であることが確認された(表2)。今回のメタボローム解析では代謝産物の絶対量測定を行っていないため、胆汁酸組成率の変化については不明である。

7. 血漿総ビリルビン値、ALT値に群間差はみられなかった。

犠死時血漿サンプル中の総ビリルビン、ALT値にsham群との間に差はみられず、またビリルビン上昇がないことから胆汁鬱滞はないものと考えられた(図11)。

8. B-DJB群で近位 common channel 部腸管の *FABP6*、*FGF15* 発現が上昇した。

採取した3ヶ所の部位の小腸における定量PCR検査では、common channelに相当するTreitz靱帯から35cmの部位の遠位空腸で、*FABP6*、*FGF15*ともにB-DJB群の遺伝子発現亢進がみられた(図12、13)。ASBTおよびOST α のmRNA量は、Treitz靱帯から20cmの部位の空腸で、A-DJB群がsham群に比し、それぞれ有意に高値および低値となっていた(図14、15)。遠位回腸ではこれら4つの遺伝子のmRNA量に有意

1 差はみられなかった。

2 **9. 肝臓の *FXR*, *SHP*, *CYP7A1* 発現に群間差はみられなかった。**

3 胆汁酸合成の変化を検証するため、肝臓での胆汁酸合成に関与する *CYP7A1*、*FXR*

4 および *SHP* の遺伝子発現を定量 PCR で評価したが、有意差は認めなかった(図 16)。

5 **10. B-DJB 群で腸内細菌叢構成に変化がみられた。**

6 回腸内容サンプルの腸内細菌叢の主成分分析で B-DJB 群の分布が他群と異なる傾

7 向がみられ、S 状結腸から採取した糞便サンプルでは差異がより顕著となった(図 17)。

8 細菌叢構成比については、回腸内容、糞便ともに B-DJB 群で、肥満形成と関連があ

9 ると報告されている *Clostridium* 属、*Turicibacter* 属の著明な減少と、乳酸や酪酸など

10 の短鎖脂肪酸を産生し、宿主のエネルギー代謝を亢進させる作用を有する

11 *Bifidobacterium* 属、*Olsenella* 属の著明な増加が認められ、これらは減量手術後の変化

12 として既報と矛盾しない結果であった(図 18、19)³⁴⁻³⁸。また、B-DJB 群では、肥満者

13 に少なく、非肥満者に多いとされる *Bacteroides* 属の減少が認められた。J-DJB 群では

14 このような構成比の大きな変化はなく、A-DJB 群では *Lactbacillus* 属の増加と

15 *Tuicibacter* 属の減少が認められた。

1 V. 考察

2 A-DJB 群では体重増加抑制を伴わない耐糖能改善効果がみられ、B-DJB 群では体重
3 増加抑制効果と、より大きな耐糖能改善効果が確認された。また B-DJB 群では脂質
4 代謝も最も改善していると考えられた。B-DJB 群の BP-limb に相当する空腸を全て切
5 除したモデルの J-DJB 群では、Sham 群と同等の体重増加がみられ、また食事負荷試
6 験時の血糖値でも改善効果がみられなかった。このことから、B-DJB 群でみられた効
7 果は、食物が通過する小腸が約 3 分の 2 に短縮化することによる消化吸收能の低下、
8 いわゆる短腸によるものではなく、BP-limb が直接的な作用を有していると考えられ
9 た。術後 12 週の犠死亡時サンプルで測定した血中アルブミン濃度に差異がなかった
10 こと、また予備実験時の 5 群で測定したデータではあるが、乾燥糞中の中性脂肪含有
11 量が 2.25~6.08mg/g (n = 3~5)と微量で群間差がみられなかったことなどからも栄養状
12 態の低下や消化吸收の低下はどの群でも生じていないものと考えられる。このほか
13 B-DJB 群では血漿総胆汁酸濃度の上昇と腸内細菌叢の変化が確認されており、B-DJB
14 群でみられた効果にこれらが関与していることが推測される。BP-limb が術後体重変
15 化や糖脂質代謝に直接的に影響を与え、また血漿胆汁酸濃度に関与するという報告は
16 これまでになく、減量手術の機序解明に資する新しい知見であると考えられる(図 20)。

17 胆汁酸は、食事中的脂質吸収への関与だけでなく、エネルギー消費や糖脂質代謝な
18 どに大きな影響をおよぼすことがわかり、近年、代謝調節因子としての作用が注目さ
19 れている。CDCA や DCA などの極性の高い胆汁酸は TGR5 や FXR の活性化作用が強

く、これら受容体の活性化は骨格筋や褐色脂肪組織でのエネルギー代謝を亢進し、また肝臓での糖や脂質新生を制御し、インスリン感受性を改善する作用がある^{11-15, 39}。

一方、UDCAのような親水性の高い胆汁酸ではTGR5やFXRの活性化作用はきわめて弱い^{39, 40}。この親水性胆汁酸であるUDCAが分子シャペロンとして作用し、肥満モデルマウスの小胞体ストレスを軽減することにより、肝臓の糖代謝およびインスリン感受性を改善することや¹⁶、また肥満者へのタウリン抱合UDCA投与により肝臓および骨格筋のインスリン感受性が増強することが報告されている⁴¹。今回の研究でB-DJB群は多くの胆汁酸種の血漿中濃度がsham群より高値となっており、これらのような効果が生じていることが推測される。

胆汁酸ホメオスタシスは複数のfeedback系により厳密に制御されているが、B-DJB群では胆汁酸の合成、吸収のどちらか、または双方に変化が生じていると考えられる。

胆汁酸は肝細胞でコレステロールの異化により産生されるが、CYP7A1はこの際の代表的な限速酵素の1つであり、この発現はFGF19やFXR-SHP系によって制御されている¹⁵。FGF19やFXRの発現には胆汁酸刺激が関与しており、胆汁酸が自身の合成に負のフィードバックを行っていることになる(図21a)¹⁵。また十二指腸内へ排出された胆汁酸は、主に回腸で上皮細胞のASBTおよびOATP3にて能動的に吸収され、FABP6により細胞内を移動し、基底膜側ではOST $\alpha\beta$ ヘテロ二量体により門脈へと排出される(図21b)³¹。胆汁酸はFXRを介してOST $\alpha\beta$ とFABP6の発現を亢進、またASBTの発現を抑制し、これにより上皮細胞内の胆汁酸濃度は一定に制御されている³¹。門

1 脈中の胆汁酸はほとんどが肝臓で吸収されるが、一部は吸収されずに大循環へと回る
2 ³¹。肝臓での胆汁酸合成に関与する CYP7A1、FXR、SHP は今回の研究では差がみら
3 れなかった。ASBT と OST α の発現は、A-DJB 群の Treitz 靱帯から 20cm の部位の空
4 腸で変化がみられたが、同部位は A-limb に相当し胆汁酸が腔内を通過しないことに
5 よる上皮細胞内の胆汁酸濃度の低下を反映しているものと考えられる。FABP6 および
6 FGF15 は、common channel 起始部(遠位空腸)で B-DJB 群で sham 群に比し発現が上昇
7 しており、同領域の胆汁酸吸収に変化が生じている可能性があるが、ASBT、OST α
8 には有意差がなく詳細は不明である。また今回の研究では門脈からの胆汁酸取込みに
9 関わる肝細胞の membrane transporter については検証していない。また血中ビリルビ
10 ン値の上昇を認めなかったことから胆汁鬱滞に伴う二次的な上昇は否定的である。

11 血中胆汁酸濃度が VSG、RYGB や IT で上昇することはヒトおよびげっ歯類モデル
12 で確認されており、これが肝臓や末梢臓器での胆汁酸シグナルを活性化し代謝改善を
13 もたらすと考えられている ¹⁷⁻¹⁹。DJB では同様の報告はこれまでになく、DJB 後の血
14 中胆汁酸濃度上昇を確認した初めての報告となる。血中胆汁酸濃度の上昇について、
15 バイパス手術や IT により、胆汁酸の腸肝循環が短絡化されることが胆汁酸濃度上昇
16 に寄与しているという仮説などが提唱されているが、消化管からの吸収、門脈から肝
17 細胞への取込み、肝臓での胆汁酸合成について詳細に検証、解析した報告はいまだな
18 く、その機序は解明されていない ⁴²。肥満ラットで、総肝管と回腸をシリコンチュー
19 ブでバイパスし胆汁を直接回腸に流し込むモデルを作成したところ、血中の胆汁酸増

1 加を認め、腸肝循環の短絡化がその機序であるという報告もあるが⁴²、本研究におい
2 ては A-DJB、J-DJB 群ともに腸肝循環の短絡化という点では B-DJB 群と差異はないに
3 も関わらず、胆汁酸の増加がみられたのは B-DJB 群のみであった。前述のモデルは
4 胆汁と膵液を分流していることなどから、RYGB や DJB に外装できるバイパスモデ
5 ルとなりえない可能性もある。また、胃袖状切除でも血中胆汁酸上昇が報告されてい
6 ることから、腸肝循環の短絡化では説明のつかない機序も存在していると考えられ
7 る¹⁷。胃袖状切除後は胃酸の分泌が減少するため、またバイパス手術では胃液は A-limb
8 を通過するため、上部空腸内の pH が通常より上昇していることが推測され、この腸
9 内環境の変化が胆汁酸吸収に変化をおよぼしている可能性も否定できない。上部空腸
10 における pH と胆汁酸吸収の関連性や食物と混合しないことで胆汁酸吸収がどのよう
11 に変化するかについて検証した報告はなく、本研究でも BP-limb では胆汁酸に関連す
12 る遺伝子発現に変化はみられなかったが、空腸での胆汁酸吸収(拡散による受動吸収)
13 量は全消化管吸収量の 30%に達し、上部空腸に相当する BP-limb での胆汁酸吸収の変
14 化は胆汁酸ホメオスタシス全体に影響をおよぼす可能性があり、今後詳細に検証する
15 必要がある。今回の結果からは、血中胆汁酸濃度上昇の機序を明らかにすることがで
16 きなかったが、胆汁酸が自身の吸収・合成系へのフィードバック作用を有しているこ
17 とが、検証を困難としている一因と考えられる。また、今回は食後の動的な変化を捉
18 えるために食事負荷後 60 分で臓器サンプルの採取を行っており、サンプル採取のタ
19 イミングによっては今回解析した遺伝子発現にも差異が生じている可能性も否定で

1 きない。

2 腸内細菌叢が宿主のエネルギー代謝や胆汁酸組成に影響を与え、肥満、糖尿病や肝
3 細胞癌の発症に関与することや減量手術後に腸内細菌叢が変化することが報告され
4 ており、減量手術の代謝改善機序に腸内細菌叢は大きく関与していると考えられてい
5 る³⁴⁻³⁸。実際に、RYGB 施行後の食餌誘発性肥満マウスの腸内細菌叢を無菌マウスに
6 移植したところ、体重や体脂肪が減少したとの報告もある⁵。今回の研究でも B-DJB
7 群の腸内細菌叢組成は主成分分析で sham 群とは異なる分布をみせた。また、B-DJB
8 群では肥満形成と関連があるとされる細菌属の構成比の減少と、短鎖脂肪酸を産生し
9 宿主のエネルギー代謝を亢進するとされる細菌属の増加を認め、これら細菌叢構成の
10 変化が B-DJB 群の代謝改善に寄与していると考えられる。一部の腸内細菌は一次胆
11 汁酸を種々の二次胆汁酸に変換し腸内および血中胆汁酸組成に影響をおよぼしてい
12 る。実際に腸内細菌叢組成を抗生剤投与により人為的に変化させたところ、血中胆汁
13 酸組成に変化を認めたとする報告があり³⁴、本研究でも胆汁酸吸収の中心である回腸
14 内容物の細菌叢構成に変化がみられていることから血中胆汁酸組成にも少なからず
15 関与していると考えられる。

16 術後に腸内細菌叢が変化することについては、カロリー摂取量や嗜好の変化、栄養
17 素と胆汁膵液の通過ルートの変更の関与や宿主の代謝改善の結果としての腸内環境
18 の変化などが挙げられているが、いまだ詳細は不明である⁵。今回の研究では摂餌量
19 は術後も各群変化がなく、腸内細菌叢の変化は宿主側因子の変化に伴うものといえる。

さらに、A-DJB 群と J-DJB 群では sham 群との間に大きな差異を認めなかったことから、バイパス術後の細菌叢変化は栄養素などの通過ルートの変更にとまなう回腸から結腸の腸内環境の直接的な変化に起因するというよりは、BP-limb が間接的に作用していることが推測される。

A-limb を長く、BP-limb を短く設定した A-DJB 群では体重増加抑制を伴わない耐糖能改善効果がみられたが、血漿総胆汁酸濃度、消化管ホルモンに有意な変化はなく、腸内細菌叢にも著明な差異はみられず、その機序は今回の研究からは不明であった。A-DJB 群の A-limb の 90%に相当する空腸が切除されたモデルでもある J-DJB 群では食事負荷試験で sham 群と有意差がみられなかったことから、A-limb 自体にも糖代謝を改善する機能の存在が推察される。インスリン負荷試験の結果が A-DJB 群と J-DJB 群がほぼ同等であり、ピルビン酸負荷試験では A-DJB 群の方が低値となっていたことを考慮すると、A-DJB 群において、インスリン感受性改善には common channel を短くすることが、肝臓の糖新生抑制には A-limb を長くすることが関与している可能性がある。これまでも A-limb について limb 自体のエネルギー消費亢進や腸-脳-肝の迷走神経ネットワークの活性化を通じた肝臓の糖新生抑制効果などが報告されており、本研究でも同様のメカニズムが機能しているかもしれない^{44,45}。ただし、A-DJB 群でも BP-limb は 3 cm と短いながらも存在しており、この BP-limb が代謝改善効果を発揮している可能性も考慮しなければならない。

本研究の術式は、腸管バイパスの効果、機序を検証するために DJB を採用したが、

1 実臨床では DJB 単独で行われることは多くはなく、胃袖状切除術に併施されること
2 がほとんどである。また胃袖状切除と DJB を組み合わせた術式と、世界的により汎
3 用されている RYGB の優劣についてのエビデンスレベルの高い報告はなく、metabolic
4 surgery の術式確立や術式選択基準の確立には臨床、基礎双方においてさらなる検証を
5 要する。現在、アジア人においては中等度肥満(BMI27.5 以上)の糖尿病患者に対して
6 も metabolic surgery が治療の選択肢として考慮されるようになってきており^{46, 47}、今
7 後さらに非肥満の糖尿病患者にまで適応が拡大されるようなことになれば、胃容量を
8 減らし摂取カロリーを物理的に制限するという restrictive な側面をもたない DJB 単独
9 手術という選択肢もありうると考えられる。

10 今回の研究では消化管ホルモンの血漿中濃度は食事負荷後 60 分値のみの測定であ
11 り、空腹時の基礎値や食事負荷後の経時的変化は測定していない。また GLP-1 と同じ
12 くインクレチンホルモンである GIP や、アディポカインの解析も行っておらず、それ
13 ぞれのモデルで生じた現象へのこれらホルモンの関与を十分に検証できていない。ほ
14 かにも血漿胆汁酸濃度や体重、糖代謝、腸内細菌叢が術後のどのタイミングで誘導さ
15 れてくるか、どのパラメータにそれぞれ関連性があるか、長期的な効果が維持できる
16 かが不明であり、今後の課題である。また、非肥満糖尿病ラットや食餌誘発性肥満ラ
17 ット、マウスなどで今回の結果の再現性も確認する必要がある。このように機序や再
18 現性について今後更なる検証を要するが、今回の研究成果は DJB 後に血漿胆汁酸濃
19 度が上昇することを明らかにし、また BP-limb が重要な機能を果たしていることを示

- 1 峻する新規の知見であり、減量手術の機序解明に大きく資するものと考えられる。

1 VI. 結語

- 2 2 型糖尿病モデルラットに対する DJB において、A-limb は体重増加抑制を伴わない
- 3 耐糖能改善効果、BP-limb は体重増加抑制作用とより大きな耐糖能改善作用を有し、
- 4 BP-limb の作用機序には血漿胆汁酸が関与している可能性がある。BP-limb のこれら
- 5 の作用についてはこれまでに報告のない新規の知見であり減量手術の機序解明に大
- 6 きく資するものと考えられる。

1 VII. 謝辞

2 本研究につき、御指導、御鞭撻を賜りました東北大学大学院医学系研究科外科病態
3 学講座生体調節外科学分野・海野倫明教授、内藤剛准教授、長尾宗紀助教および東北
4 薬科大学病院消化器外科・柴田近部長(生体調節外科学分野前准教授)に深甚なる謝意
5 を表します。また、本研究は味の素株式会社イノベーション研究所との共同研究の一
6 環として行われ、同研究所主席研究員の北原吉朗様には実験計画立案やサンプル解析
7 などにおいて多大なる御支援を賜り、衷心より感謝申し上げます。さらに実験にご協
8 力いただきました実験助手の渋谷恵美子様、動物実験室の皆様に厚く御礼申し上げま
9 す。

10

VIII. 参考文献

1. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2004; 292(14):1724-37.
2. Mingrone G, Panunzi S, De Gaetano A, et al. Bariatric surgery versus conventional medical therapy for type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2012; 366(17):1577-85.
3. Sjostrom L. Review of the key results from the Swedish Obese Subjects (SOS) trial - a prospective controlled intervention study of bariatric surgery. *J Intern Med* 2013; 273(3):219-34.
4. Buchwald H, Oien DM. Metabolic/bariatric surgery worldwide 2011. *Obes Surg* 2013; 23(4):427-36.
5. Liou AP, Paziuk M, Luevano JM, Jr., et al. Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity. *Sci Transl Med* 2013; 5(178):178ra41.
6. Gerhard GS, Styer AM, Wood GC, et al. A role for fibroblast growth factor 19 and bile acids in diabetes remission after Roux-en-Y gastric bypass. *Diabetes Care* 2013; 36(7):1859-64.
7. Ionut V, Bergman RN. Mechanisms responsible for excess weight loss after bariatric surgery. *J Diabetes Sci Technol* 2011; 5(5):1263-82.
8. Orci L, Chilcott M, Huber O. Short versus long Roux-limb length in Roux-en-Y

- gastric bypass surgery for the treatment of morbid and super obesity: a systematic review of the literature. *Obes Surg* 2011; 21(6):797-804.
9. Imoto H, Shibata C, Ikezawa F, et al. Effects of duodeno-jejunal bypass on glucose metabolism in obese rats with type 2 diabetes. *Surg Today* 2014; 44(2):340-8.
 10. 宮地智洋, 柴田 近, 内藤 剛, 他 : Duodenojejunal bypass において、alimentary limb および biliopancreatic limb の長さが糖尿病改善効果におよぼす影響 : 2 型糖尿病モデルラットでの検討. 日本肥満症治療学会学術集会プログラム・抄録集. 2013;31:110.
 11. Houten SM, Watanabe M, Auwerx J. Endocrine functions of bile acids. *EMBO J* 2006; 25(7):1419-25.
 12. Thomas C, Auwerx J, Schoonjans K. Bile acids and the membrane bile acid receptor TGR5--connecting nutrition and metabolism. *Thyroid* 2008; 18(2):167-74.
 13. Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, et al. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7(8):678-93.
 14. Keitel V, Kubitz R, Haussinger D. Endocrine and paracrine role of bile acids. *World J Gastroenterol* 2008; 14(37):5620-9.
 15. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, et al. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 2009; 89(1):147-91.
 16. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, et al. Chemical chaperones reduce ER stress and

- restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 2006; 313(5790):1137-40.
17. Myronovych A, Kirby M, Ryan KK, et al. Vertical sleeve gastrectomy reduces hepatic steatosis while increasing serum bile acids in a weight-loss-independent manner. *Obesity (Silver Spring)* 2014; 22(2):390-400.
 18. Patti ME, Houten SM, Bianco AC, et al. Serum bile acids are higher in humans with prior gastric bypass: potential contribution to improved glucose and lipid metabolism. *Obesity (Silver Spring)* 2009; 17(9):1671-7.
 19. Kohli R, Kirby M, Setchell KD, et al. Intestinal adaptation after ileal interposition surgery increases bile acid recycling and protects against obesity-related comorbidities. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 299(3):G652-60.
 20. Ryan KK, Tremaroli V, Clemmensen C, et al. FXR is a molecular target for the effects of vertical sleeve gastrectomy. *Nature* 2014.
 21. Ikezawa F, Shibata C, Kikuchi D, et al. Effects of ileal interposition on glucose metabolism in obese rats with diabetes. *Surgery* 2012; 151(6):822-30.
 22. Panchal SK, Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011:351982.
 23. Matsuzaki G, Ishizaka N, Furuta K, et al. Comparison of vasculoprotective effects of benidipine and losartan in a rat model of metabolic syndrome. *Eur J Pharmacol*

- 2008; 587(1-3):237-42.
24. Kawano K, Hirashima T, Mori S, et al. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes* 1992; 41(11):1422-8.
 25. Berthiaume N, Zinker BA. Metabolic responses in a model of insulin resistance: comparison between oral glucose and meal tolerance tests. *Metabolism* 2002; 51(5):595-8.
 26. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(3):235-53.
 27. Morton GJ, Matsen ME, Bracy DP, et al. FGF19 action in the brain induces insulin-independent glucose lowering. *J Clin Invest* 2013; 123(11):4799-808.
 28. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226(1):497-509.
 29. Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, et al. Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J Proteome Res* 2003; 2(5):488-94.
 30. Nakahara M, Furuya N, Takagaki K, et al. Ileal bile acid-binding protein, functionally associated with the farnesoid X receptor or the ileal bile acid transporter, regulates bile acid activity in the small intestine. *J Biol Chem* 2005; 280(51):42283-9.

31. Pellicoro A, Faber KN. Review article: The function and regulation of proteins involved in bile salt biosynthesis and transport. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26 Suppl 2:149-60.
32. Trauner M, Claudel T, Fickert P, et al. Bile acids as regulators of hepatic lipid and glucose metabolism. *Dig Dis* 2010; 28(1):220-4.
33. Sakamoto M, Hayashi H, Benno Y. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis for human fecal microbiota and its application for analysis of complex bifidobacterial communities. *Microbiol Immunol* 2003; 47(2):133-42.
34. Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, et al. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature* 2013; 499(7456):97-101.
35. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444(7122):1027-31.
36. Kugelberg E. Surgery: Altered gut microbiota trigger weight loss. *Nat Rev Endocrinol* 2013; 9(6):314.
37. Aron-Wisnewsky J, Clement K. The effects of gastrointestinal surgery on gut microbiota: potential contribution to improved insulin sensitivity. *Curr Atheroscler Rep* 2014; 16(11):454.
38. Kimura I, Ozawa K, Inoue D, et al. The gut microbiota suppresses insulin-mediated

- fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat Commun* 2013; 4:1829.
39. Makishima M. Identification of a Nuclear Receptor for Bile Acids. *Science* 1999; 284(5418):1362-1365.
40. Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, et al. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298(5):714-9.
41. Kars M, Yang L, Gregor MF, et al. Tauroursodeoxycholic Acid may improve liver and muscle but not adipose tissue insulin sensitivity in obese men and women. *Diabetes* 2010; 59(8):1899-905.
42. Kohli R, Setchell KD, Kirby M, et al. A surgical model in male obese rats uncovers protective effects of bile acids post-bariatric surgery. *Endocrinology* 2013; 154(7):2341-51.
43. 金村 稔：胆汁酸吸収および胆汁酸代謝に関する実験的研究. 日本外科学会誌. 1982;83:677-90.
44. Breen DM, Rasmussen BA, Kokorovic A, et al. Jejunal nutrient sensing is required for duodenal-jejunal bypass surgery to rapidly lower glucose concentrations in uncontrolled diabetes. *Nat Med* 2012; 18(6):950-5.
45. Saeidi N, Meoli L, Nestoridi E, et al. Reprogramming of intestinal glucose

metabolism and glycemic control in rats after gastric bypass. *Science* 2013;

341(6144):406-10.

46. Kasama K, Mui W, Lee WJ, et al. IFSO-APC consensus statements 2011. *Obes Surg*

2012; 22(5):677-84.

47. Dixon JB, Zimmet P, Alberti KG, et al. Bariatric surgery: an IDF statement for

obese Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2011; 28(6):628-42.

IX. 図の説明

図 1. (a)代表的な減量手術術式と(b)十二指腸空腸バイパスの解剖。RYGB = Roux-en-Y gastric bypass・Roux-en-Y 胃バイパス術、VSG = vertical sleeve gastrectomy・胃袖状切除術、DJB = duodenal-jejunal bypass・十二指腸空腸バイパス術、IT = ileal interposition・回腸置換術。N Eng J Med 2007;356: 2176-83、Ann Surg 2008;247:968-75 より引用。

図 2. (a)実験プロトコール。(b)各群手術モデル図。MTT = meal tolerance test、PTT = pyruvate acid tolerance test、ITT = insulin tolerance test、W.O. = weeks old、A-limb = alimentary limb、BP-limb = bilio-pancreatic limb、CC = common channel。

図 3. 予備実験における(a)術後体重増加および(b)食事負荷試験時の血糖値の推移。
予備実験では、alimentary limb と bilio-pancreatic limb の長さを 3cm または 30cm と設定して DJB モデルを作成した。食事負荷試験ではエンシュア H バニラ味 (1.5kcal/ml、脂質 28%kcal、タンパク質 15%kcal、炭水化物 57%kcal (アボットジャパン；東京))を 1.2gCHO/5.8ml/8.76kcal/kg 投与した。各群 n = 7~8。AL = alimentary limb、BPL = bilio-pancreatic limb、*, ** = $P < 0.05, 0.01$ 対 sham 群、Dunnett's test。BPL を 30cm と設定した 2 群では体重増加および血糖値がともに sham 群に

比し、有意に低値となった。

図 4. a)術前、術後 2、9 週の 1 日当たり平均摂餌量。(b)術後体重変化。n = 6、* = $P < 0.05$

対 sham 群、N.S. = not significant、Dunnett's test(摂餌量)、Turkey's test(体重変化)。

摂餌量に群間差はみられなかったが、術後体重増加は B-DJB 群のみが低値となった。

図 5. (解剖時に計測した(a)小腸全長、(b)Common channel に相当する小腸の長さ。n =

6、N.S. = not significant、Turkey's test。群間で有意差はみられなかった。標本採取

時に測定。

図 6. 術後 8 週に実施した食事負荷試験時の(a)血糖値の推移および(b)波形下面積。

(c)術後 11 週に実施したインスリン負荷試験時および(d)術後 10 週に実施したピルビ

ン酸負荷試験時の血糖値の推移。n = 6、*, **, *** = $P < 0.05, 0.01, 0.001$ 対 sham 群、

N.S. = not significant、Dunnett's test。いずれにおいても B-DJB 群が最も低値で経過

した経過した。A-DJB 群も食事負荷試験の 30 分値、波形下面積が sham 群と比較し

有意に低値となり、インスリン負荷試験、ピルビン酸負荷試験でも有意差がついた。

J-DJB 群は食事負荷試験では sham 群と同等の推移をみせ、ピルビン酸負荷試験でも

sham 群との間に有意差は認めなかった。

図 7. (a)トリグリセリド血漿中濃度、(b)トリグリセリド肝臓含有量。(c)体重当たり後腹膜脂肪組織重量。n = 6、*, ** = $P < 0.05, 0.01$ 対 sham 群、Dunnett's test。術後 12 週に標本採取した。A-DJB 群はトリグリセリド血漿濃度、後腹膜脂肪組織重量が、B-DJB 群はこれらに加えトリグリセリド肝臓含有量が sham 群に比較し、有意に低値となった。J-DJB 群は sham 群との間に有意差はみられなかった。

図 8. 血漿アルブミン濃度。n = 6、N.S. = not significant、Dunnett's test。術後 12 週、犠死時の下大静脈血サンプルを測定。Sham 群との間に有意差はみられなかった。

図 9. 各種ホルモンの血漿中濃度。GLP-1 = glucagon-like peptide-1、PYY = peptide YY、FGF15 = fibroblast growth factor15、n = 6、* = $P < 0.05$ 対 sham 群、N.S. = not significant、Dunnett's test。術後 12 週、犠死時の下大静脈血サンプルで測定。インスリンのみ B-DJB 群が sham 群と比較し、有意に低値となった。その他のホルモンでは有意差はみられなかった。

図 10. 術後 8 週に実施した食事負荷試験時の(a)血漿中総胆汁酸濃度の推移および(b)波形下面。n = 6、*, ** = $P < 0.05, 0.01$ 対 sham 群比、Dunnett's test。術後 8 週に実施。B-DJB 群が高値で推移し、60 分値と波形下面積で sham 群に比し、有意に低値となった。

図 11. (a)血漿ビリルビン濃度。(b)血漿 ALT 濃度。ALT = アラニンアミノ基転移酵素、n = 6、N.S. = not significant、Dunnett's test。術後 12 週、犠死時の下大静脈血で測定。Sham 群との間に有意差はみられなかった。

図 12. real-time PCR 法による FABP6 mRNA 発現定量。(a)Treitz 靱帯から解剖学的に 20cm 肛門側の部位に相当する空腸(A-DJB 群では alimentary limb、B-DJB 群では bilio-pancreatic limb に相当)する。(b)Treitz 靱帯から 35cm 肛門側空腸、common channel に相当する。(c) 回腸末端部。FABP6 = fatty acid binding protein 6、n = 6、*、** = $P < 0.05$, 0.01 対 sham 群、N.S. = not significant、Dunnett's test。Treitz 靱帯から 35cm 肛門側空腸で B-DJB 群が sham 群に比し有意に高値となった。

図 13. real-time PCR 法による FGF15 mRNA 発現定量。(a)Treitz 靱帯から 20cm 肛門側空腸(A-DJB 群では alimentary limb、B-DJB 群では bilio-pancreatic limb に相当)する。(b)Treitz 靱帯から 35cm 肛門側空腸、common channel に相当する。(c) 回腸末端部。FGF6 = fibroblast growth factor 15、n = 6、*、** = $P < 0.05$, 0.01 対 sham 群、N.S. = not significant、Dunnett's test。Treitz 靱帯から 35cm 肛門側空腸で B-DJB 群が sham 群に比し有意に高値となった。

図 14. real-time PCR 法による ASBT mRNA 発現定量。(a)Treitz 靱帯から 20cm 肛門側空腸(A-DJB 群では alimentary limb、B-DJB 群では bilio-pancreatic limb に相当)する。(b)Treitz 靱帯から 35cm 肛門側空腸、common channel に相当する。(c) 回腸末端部。ASBT = apical sodium-dependent bile salt transporter、n = 6、*、** = P <0.05, 0.01 対 sham 群、N.S. = not significant、Dunnett's test。Treitz 靱帯から 20cm の空腸で A-DJB 群が sham 群に比し有意に高値となった。

図 15. real-time PCR 法による OST α mRNA 発現定量。(a)Treitz 靱帯から 20cm 肛門側空腸(A-DJB 群では alimentary limb、B-DJB 群では bilio-pancreatic limb に相当)する。(b)Treitz 靱帯から 35cm 肛門側空腸、common channel に相当する。(c) 回腸末端部。OST α = organic solute transporter α 、n = 6、*、** = P <0.05, 0.01 対 sham 群、N.S. = not significant、Dunnett's test。Treitz 靱帯から 20cm の空腸で A-DJB 群が sham 群に比し有意に高値となった。

図 16. 肝臓胆汁酸合成に関与する遺伝子発現。real-time PCR 法による mRNA 発現定量。FXR = farnesoid X receptor、CYP7A1 = cytochrome P450 7A1、SHP = small heterodimer partner、n = 6、N.S. = not significant、Dunnett's test。Sham 群との間に有意差はみられなかった。

図 17. (a)回腸内容と(b)S 状結腸より採取した糞便の腸内細菌叢の主成分分析。n = 6。

回腸内容サンプルでは B-DJB 群の分布が他群と異なる傾向がみられ、S 状結腸から採取した糞便サンプルでは差異がより顕著となった。

図 18. 回腸内容の腸内細菌叢構成比(属)。n = 6。B-DJB 群で、肥満形成と関連があるとされる *Clostridium* 属、*Turicibacter* 属の減少と、宿主のエネルギー代謝を亢進させる作用を有する *Bifidobacterium* 属、*Olsenella* 属の著明な増加を認めた。

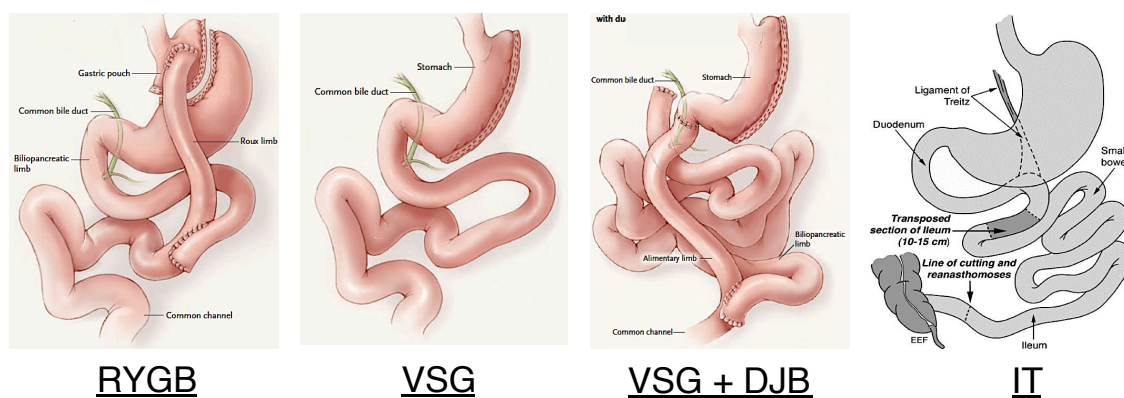
図 19. S 状結腸より採取した糞便の腸内細菌叢構成比較(属)。n = 6。回腸内容サンプルと同様に B-DJB 群で *Clostridium* 属、*Turicibacter* 属の減少と、*Bifidobacterium* 属、*Olsenella* 属の増加を認めた。非肥満者で構成比が高いとされる *Bacteroides* 属は同群では減少していた。

図 20. 本研究から推測される bilio-pancreatic limb の作用。同 limb には体重増加抑制、糖脂質代謝改善作用、血中胆汁酸増加作用があると考えられる。また、体重増加抑制、体重増加抑制、糖脂質代謝改善効果に血中胆汁酸の増加や腸内細菌叢の変化が関与していると推測される。

図 21. (a) 肝細胞における胆汁酸合成。(b) 回腸上皮の胆汁酸吸収。FGF19 = fibroblast growth factor 19、CYP7a1 = cytochrome P450 7A1 、SHP = small heterodimer partner、FXR = farnesoid X receptor、ASBT = apical sodium-dependent bile salt transporter、FABP6 = fatty acid binding protein 6、OST $\alpha\beta$ = organic solute transporter $\alpha\beta$ 。

X. 図

(a)



(b)

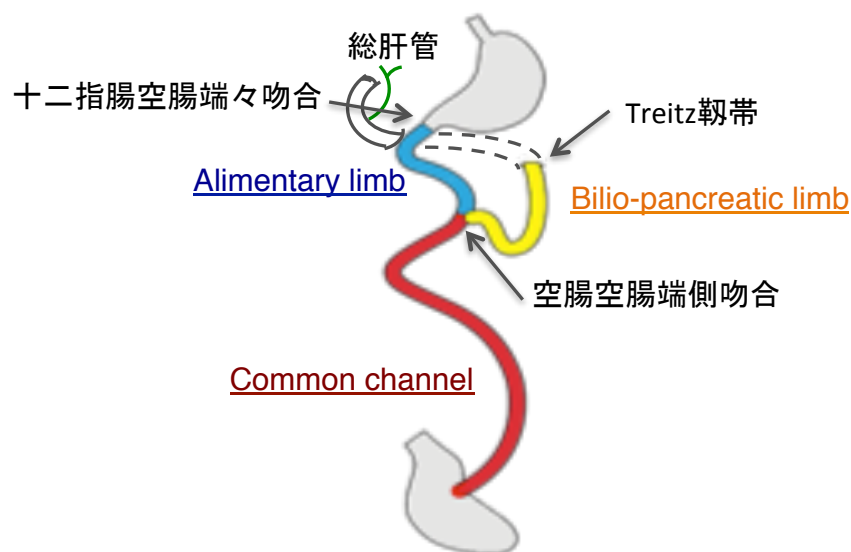


図1. (a)代表的な減量手術術式と(b)十二指腸空腸バイパスの解剖。RYGB = Roux-en-Y gastric bypass・Roux-en-Y 胃バイパス術、VSG = vertical sleeve gastrectomy・胃袖状切除術、DJB = duodenal-jejunal bypass・十二指腸空腸バイパス術、IT = ileal interposition・回腸置換術。N Eng J Med 2007;356: 2176-83、Ann Surg 2008;247:968-75より引用。

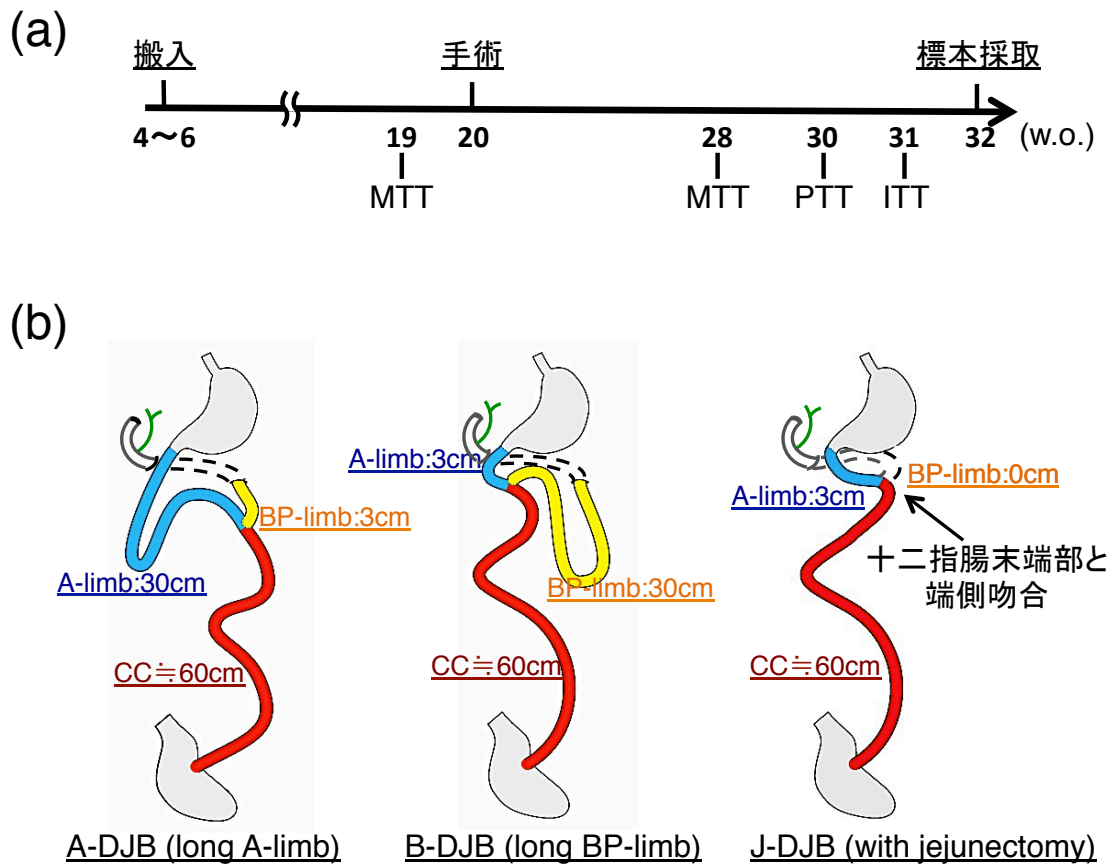


図2. (a)実験プロトコール。(b)各群手術モデル図。MTT = meal tolerance test、PTT = pyruvate acid tolerance test、ITT = insulin tolerance test、W.O. = weeks old、A-limb = alimentary limb、BP-limb = bilio-pancreatic limb、CC = common channel

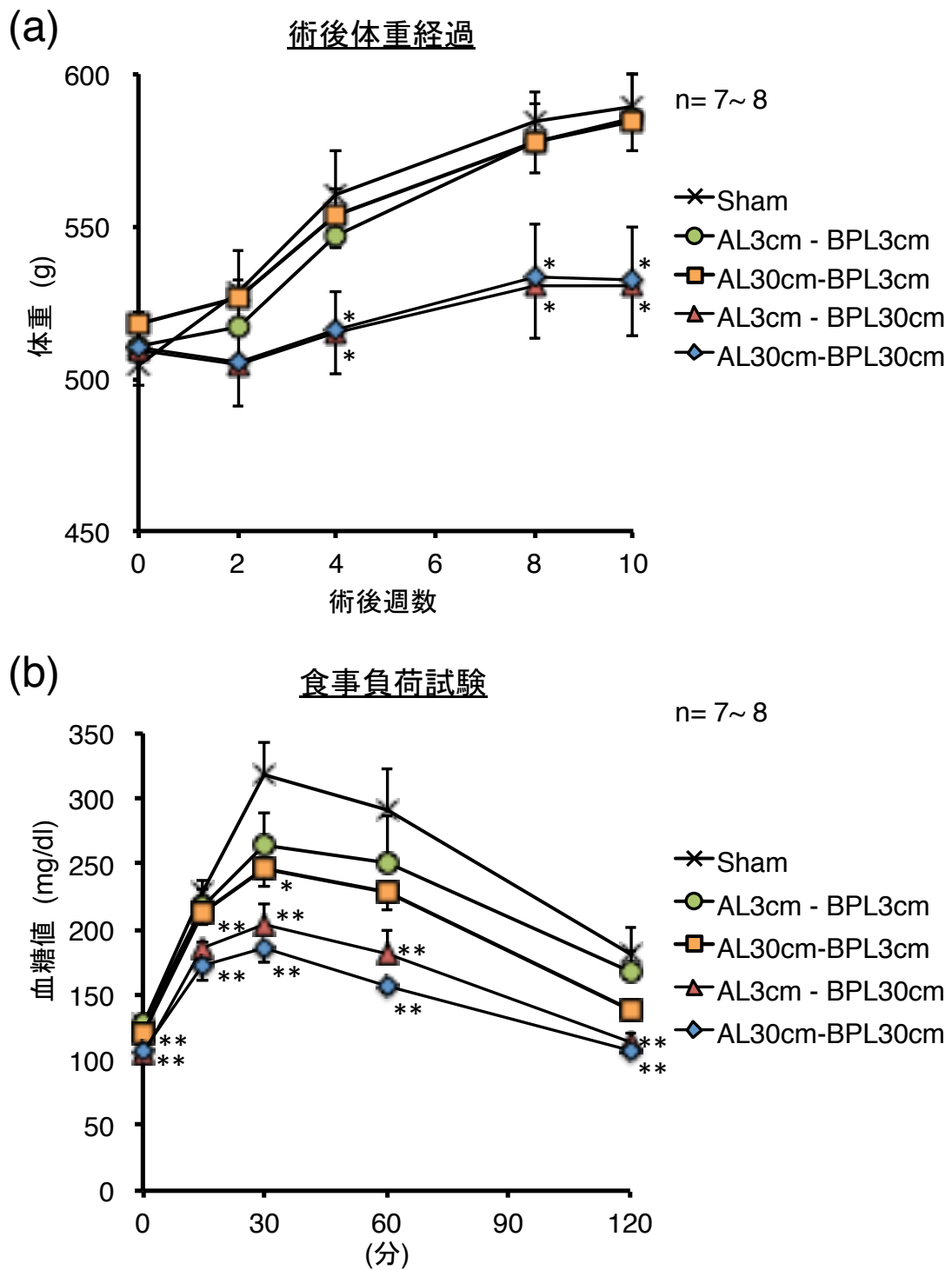


図3. 予備実験における(a)術後体重増加および(b)食事負荷試験時の血糖値の推移。予備実験では、alimentary limbとbilio-pancreatic limbの長さを3cmまたは30cmと設定してDJBモデルを作成した。各群n=7~8。AL = alimentary limb、BPL = bilio-pancreatic limb、*, ** = $P < 0.05, 0.01$ 対sham群

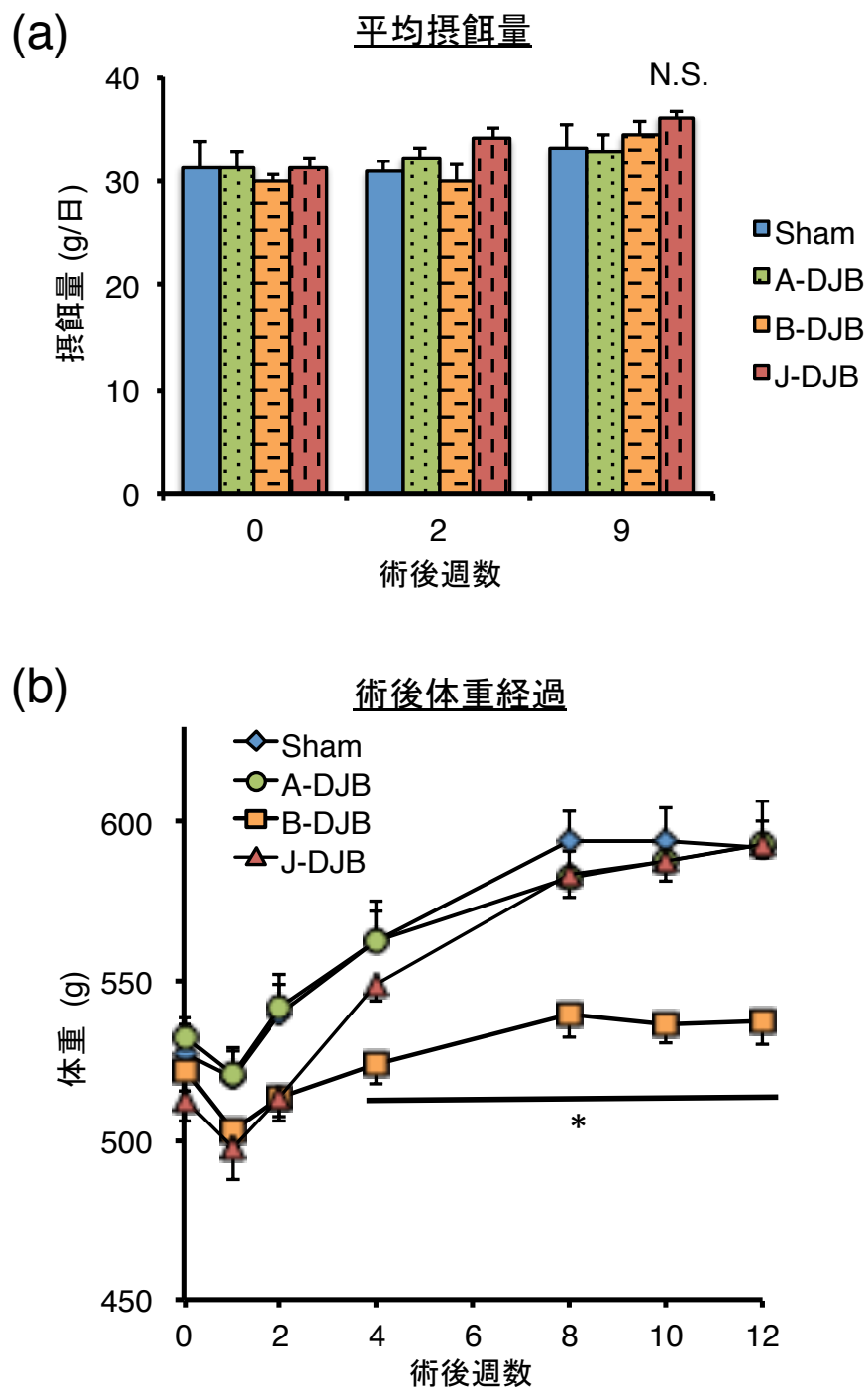


図4. (a)術前、術後2、9週の1日当たり平均摂餌量。(b)術後体重変化。
n = 6、* = $P < 0.05$ 対sham群、N.S. = not significant

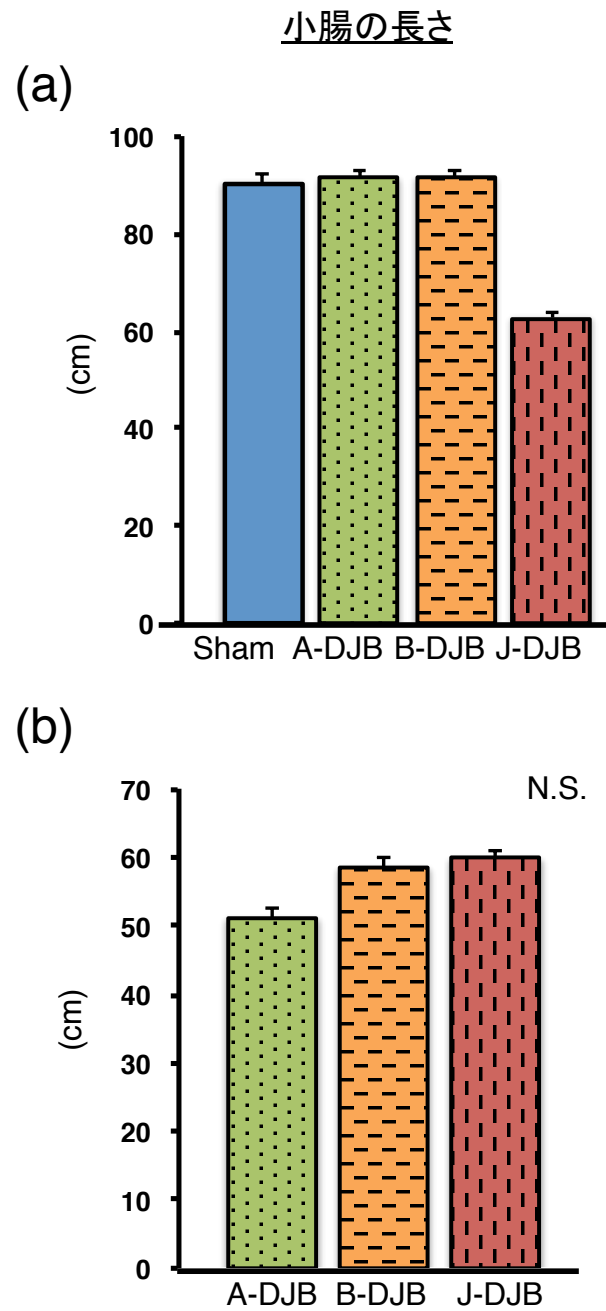


図5. 解剖時に計測した(a)小腸全長, (b)Common channelに相当する小腸の長さ。n = 6、N.S. = not significant

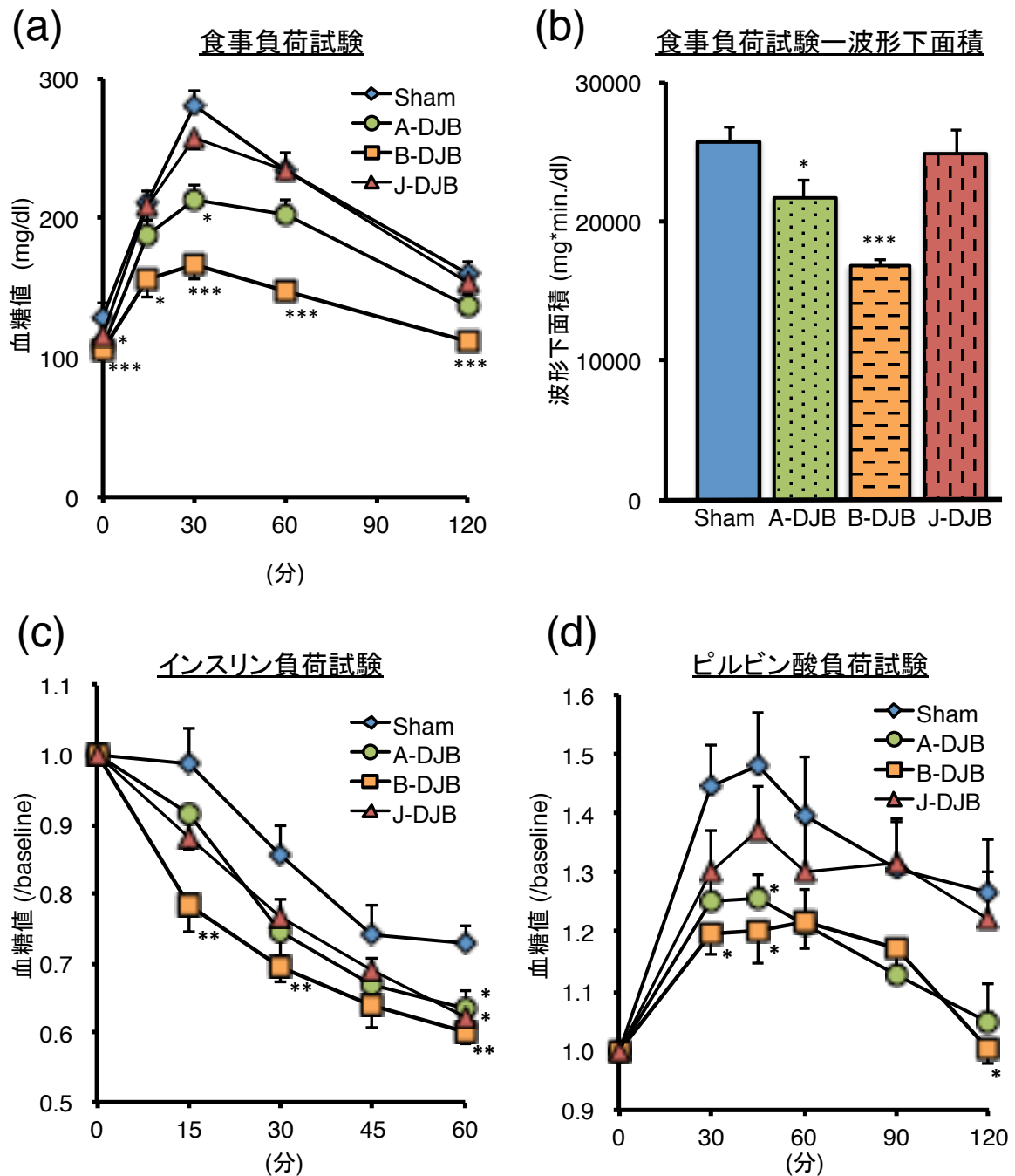


図6. 食事負荷試験時の(a)血糖値の推移および(b)波形下面積。(c)インスリン負荷試験時および(d)ピルビン酸負荷試験時の血糖値の推移。n = 6、*, **, *** = $P < 0.05, 0.01, 0.001$ 対sham群、N.S. = not significant

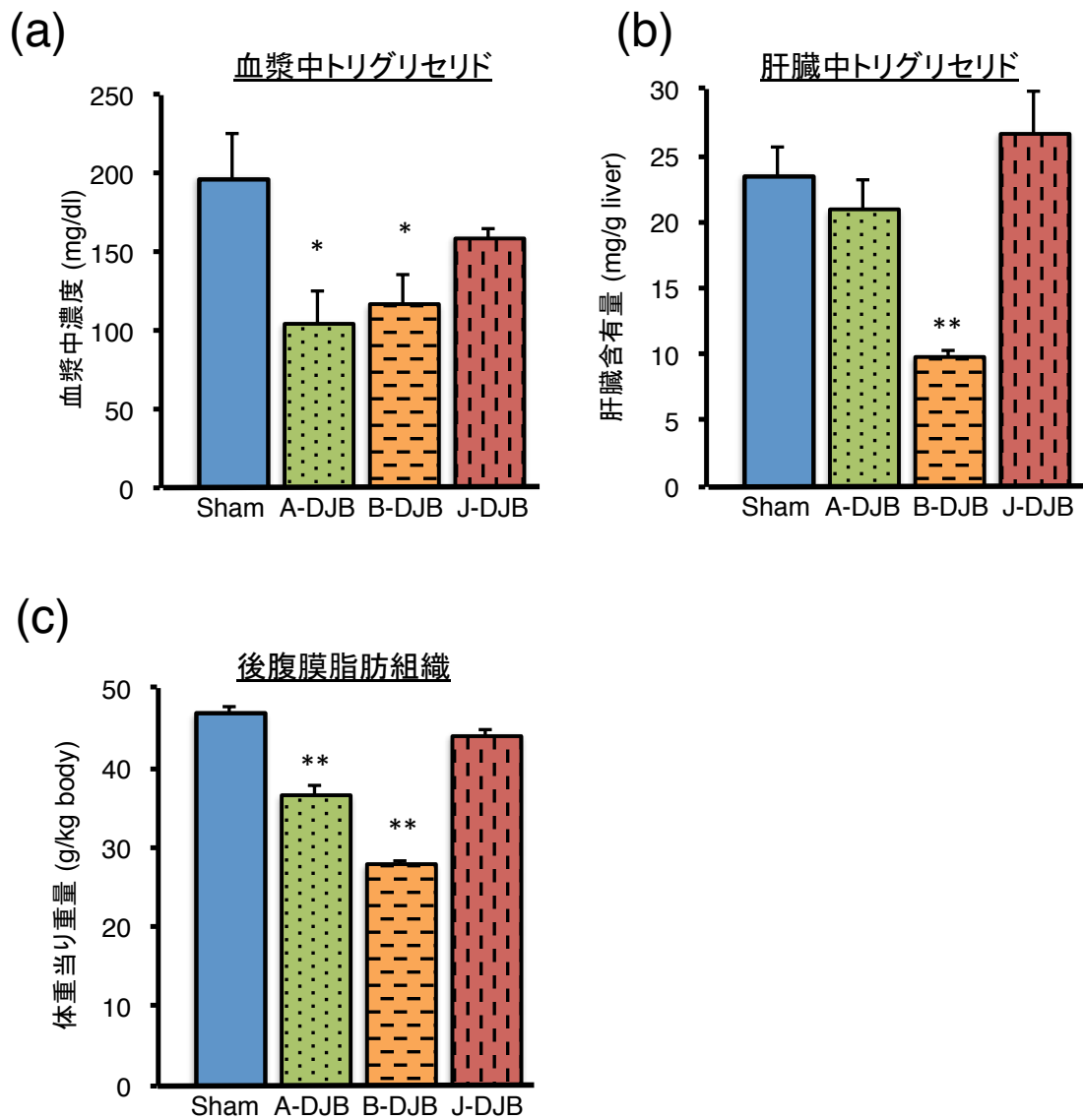


図7. (a)トリグリセリド血漿中濃度、(b)トリグリセリド肝臓含有量。
(c)体重当たり後腹膜脂肪組織重量。n = 6、*、** = P < 0.05, 0.01 対 sham群

アルブミン

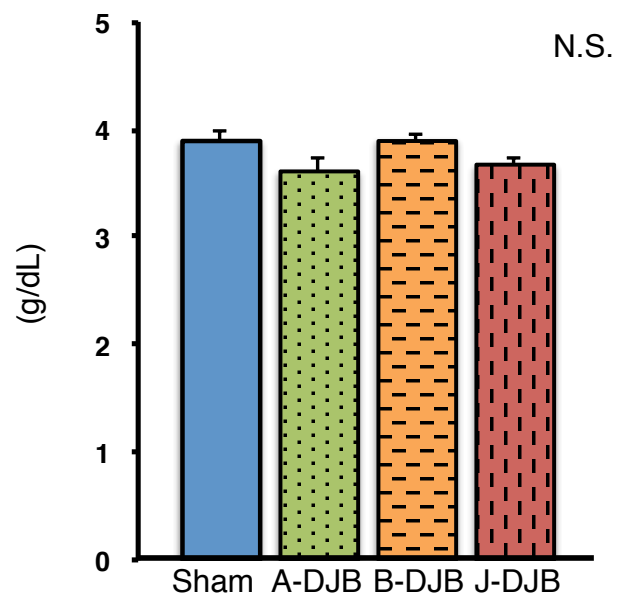


図8. 血漿アルブミン濃度。n = 6、N.S. = not significant

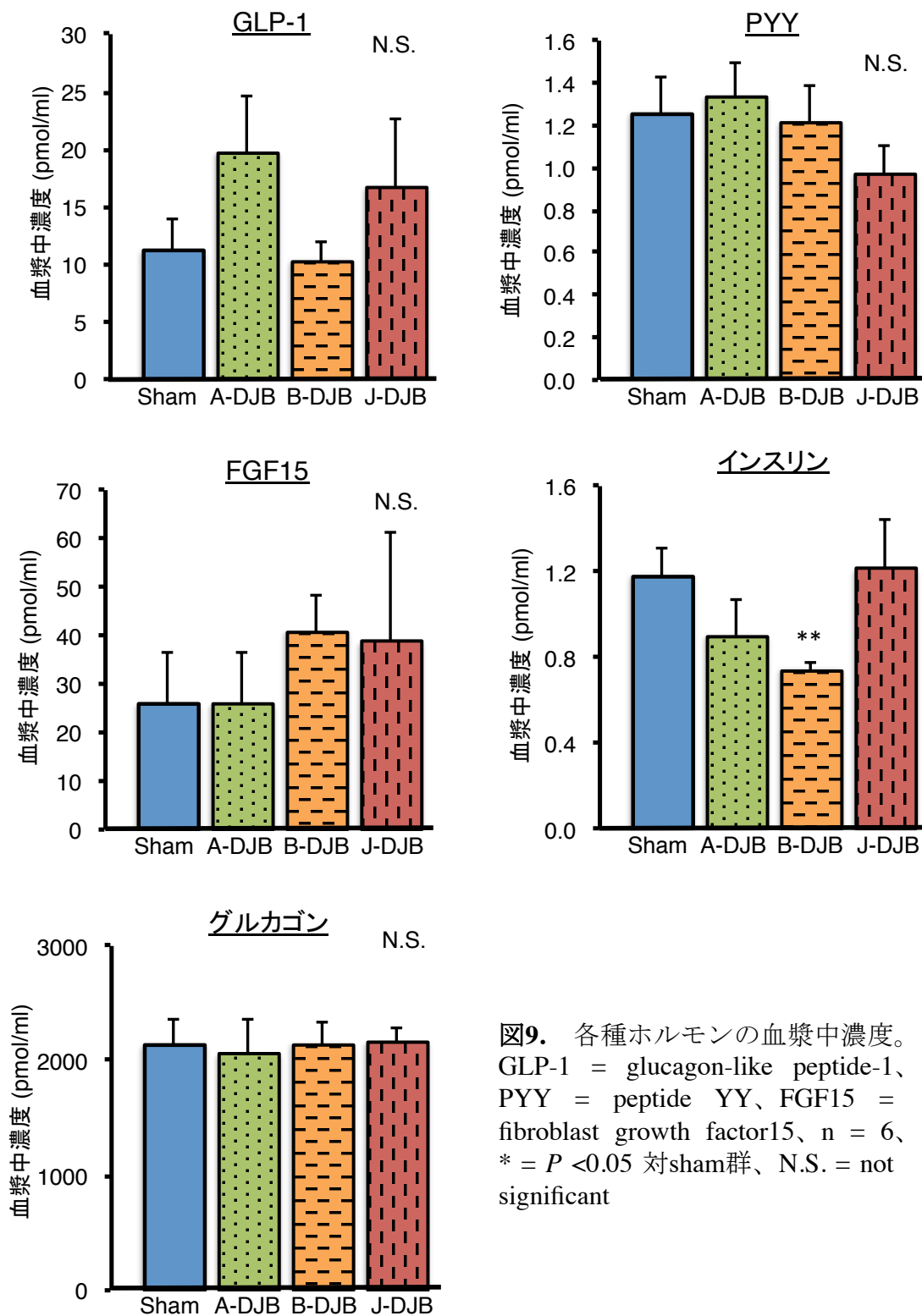


図9. 各種ホルモンの血漿中濃度。GLP-1 = glucagon-like peptide-1、PYY = peptide YY、FGF15 = fibroblast growth factor15、n = 6、* = $P < 0.05$ 対sham群、N.S. = not significant

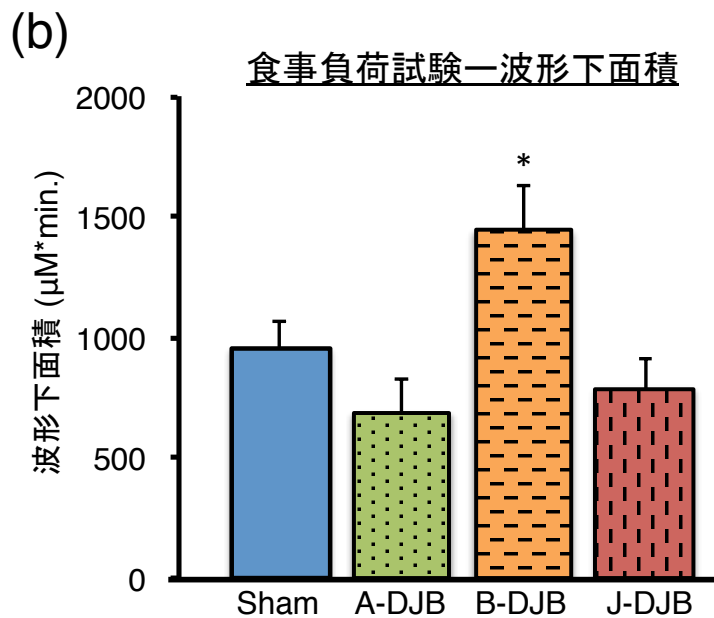
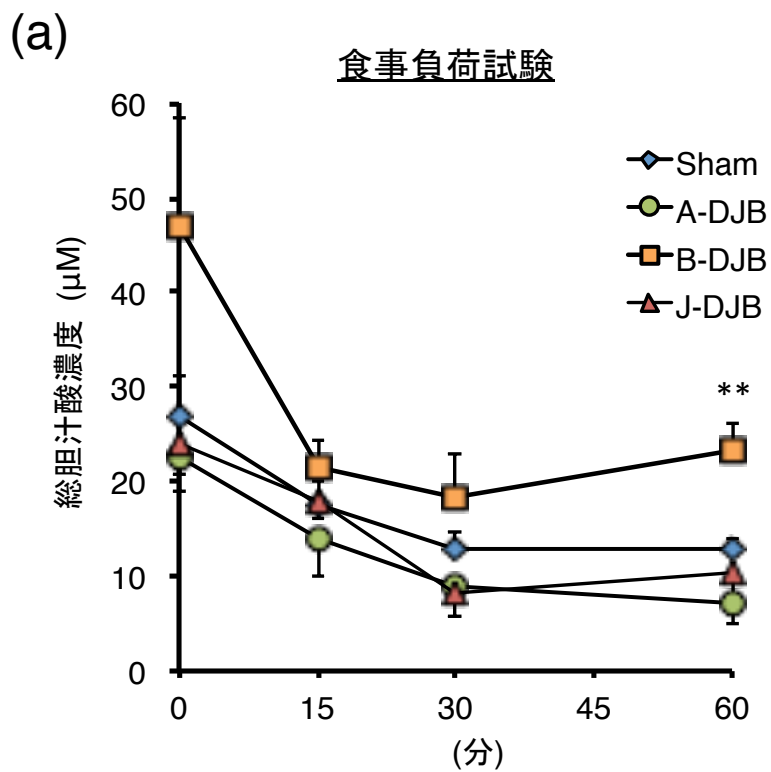


図10. 食事負荷試験時の(a)血漿中総胆汁酸濃度の推移および(b)波形下面。n = 6、*、** = $P < 0.05, 0.01$ 対sham群比

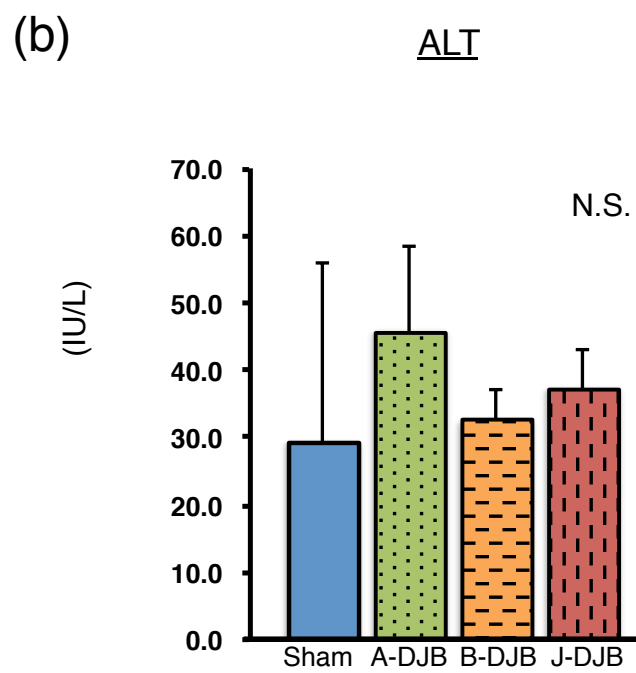
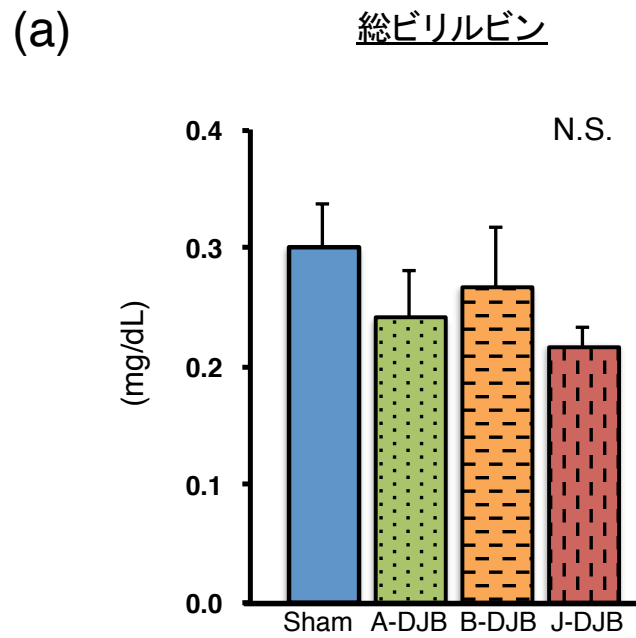


図11. (a)血漿ビリルビン濃度。 (b)血漿ALT濃度。 ALT = アラニンアミノ基転移酵素、n = 6、N.S. = not significant

FABP6

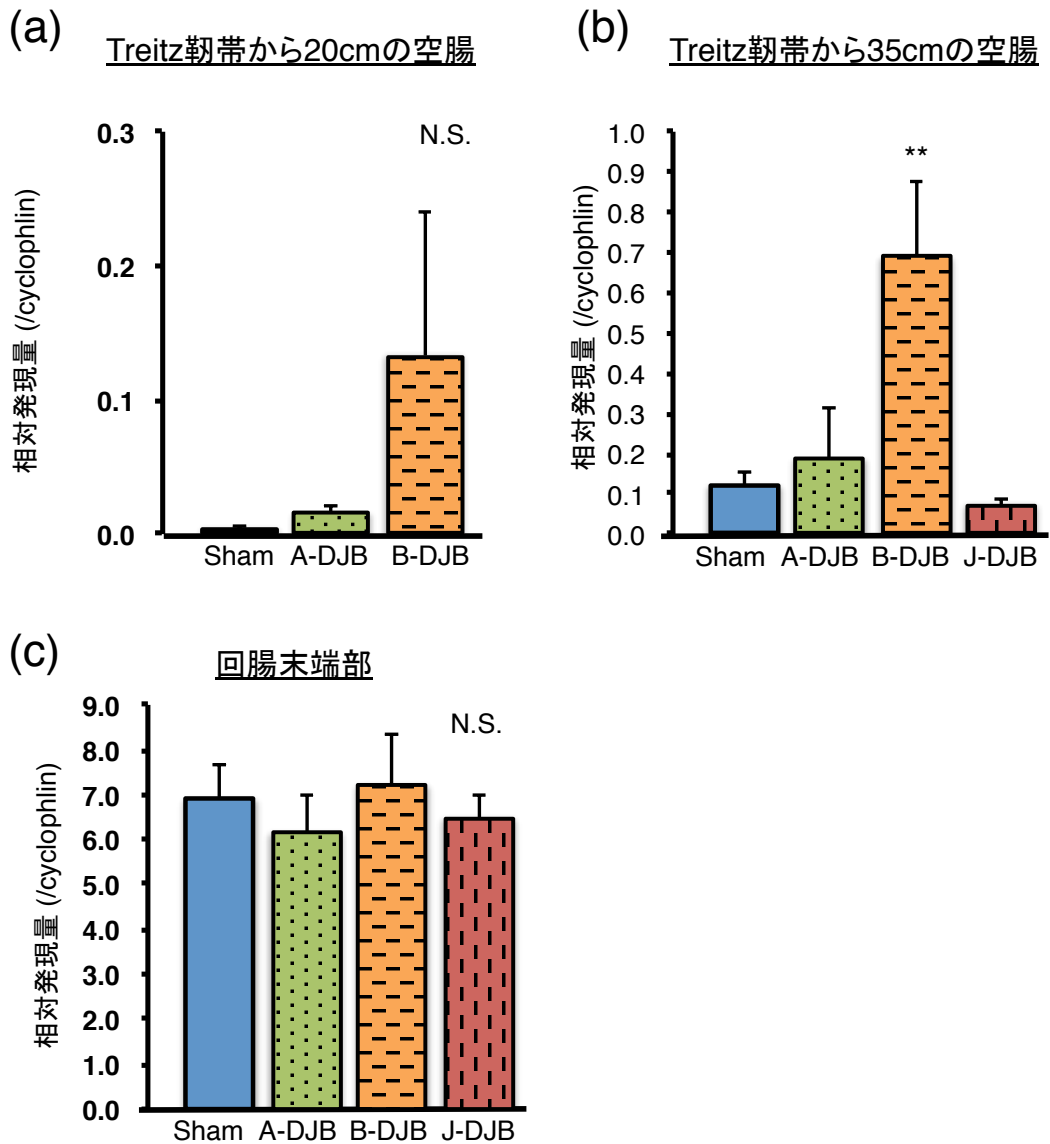


図12. real-time PCR法によるFABP6 mRNA発現定量。(a)Treitz靱帯から20cm肛門側空腸(A-DJB群ではalimentary limb、B-DJB群ではbilio-pancreatic limbに相当)する。(b)Treitz靱帯から35cm肛門側空腸、common channelに相当する。(c) 回腸末端部。FABP6 = fatty acid binding protein 6、n = 6、*、** = $P < 0.05, 0.01$ 対sham群、N.S. = not significant。

FGF15

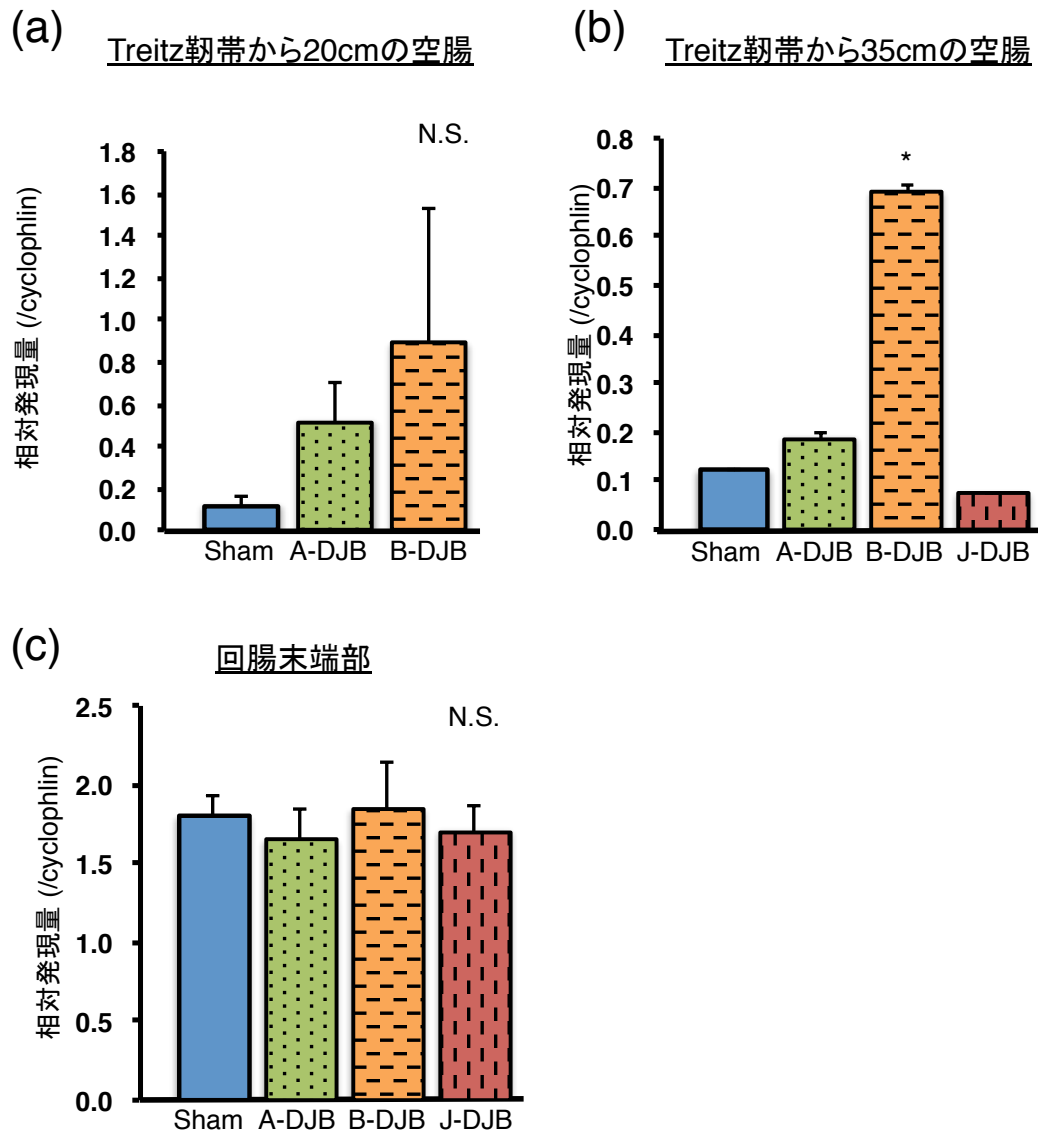


図13. real-time PCR法によるFGF15 mRNA発現定量。(a)Treitz靱帯から20cm肛門側空腸(A-DJB群ではalimentary limb、B-DJB群ではbilio-pancreatic limbに相当)する。(b)Treitz靱帯から35cm肛門側空腸、common channelに相当する。(c) 回腸末端部。FGF15 = fibroblast growth factor 15、n = 6、*、** = $P < 0.05, 0.01$ 対sham群、N.S. = not significant。

ASBT

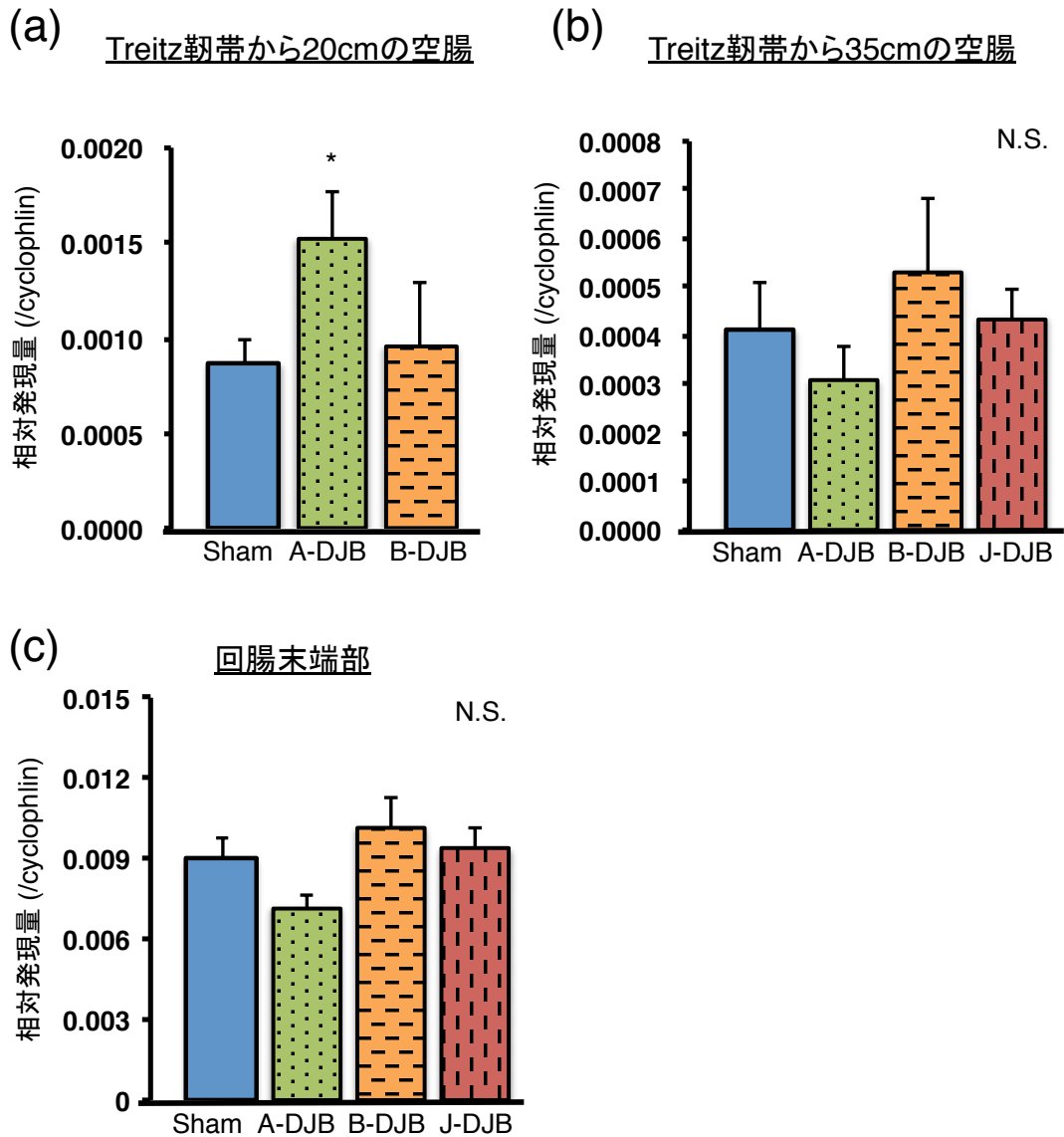


図14. real-time PCR法によるASBT mRNA発現定量。(a)Treitz靱帯から20cm 肛門側空腸(A-DJB群ではalimentary limb、B-DJB群ではbilio-pancreatic limbに相当)する。(b)Treitz靱帯から35cm肛門側空腸、common channelに相当する。(c) 回腸末端部。ASBT = apical sodium-dependent bile salt transporter、n = 6、*、** = $P < 0.05, 0.01$ 対sham群、N.S. = not significant。

OST α

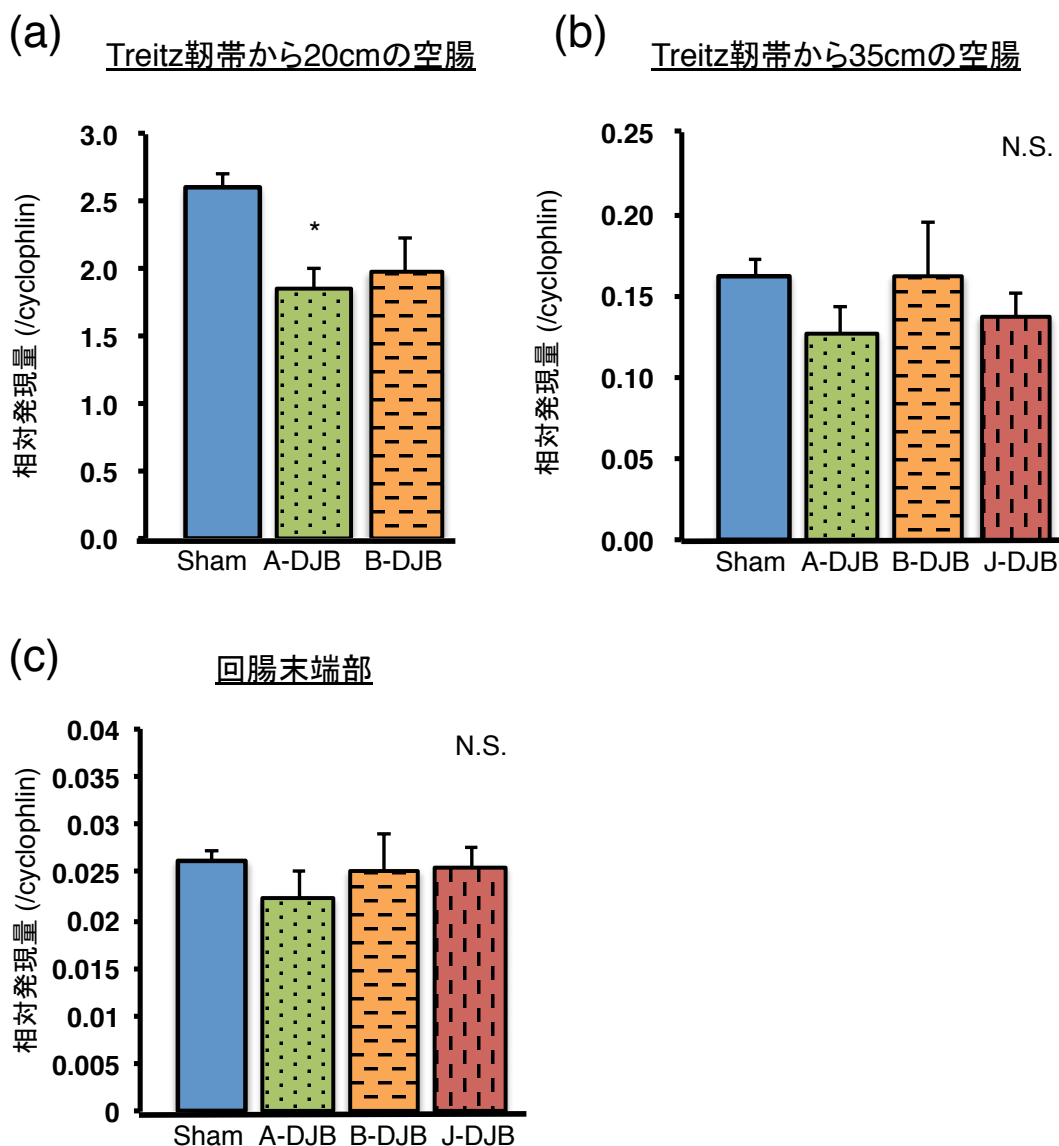


図15. real-time PCR法によるOST α mRNA発現定量。(a)Treitz靱帯から20cm 肛門側空腸(A-DJB群ではalimentary limb、B-DJB群ではbilio-pancreatic limbに相当)する。(b)Treitz靱帯から35cm肛門側空腸、common channelに相当する。(c) 回腸末端部。OST α = organic solute transporter α 、n = 6、*、** = $P < 0.05, 0.01$ 対sham群、N.S. = not significant。

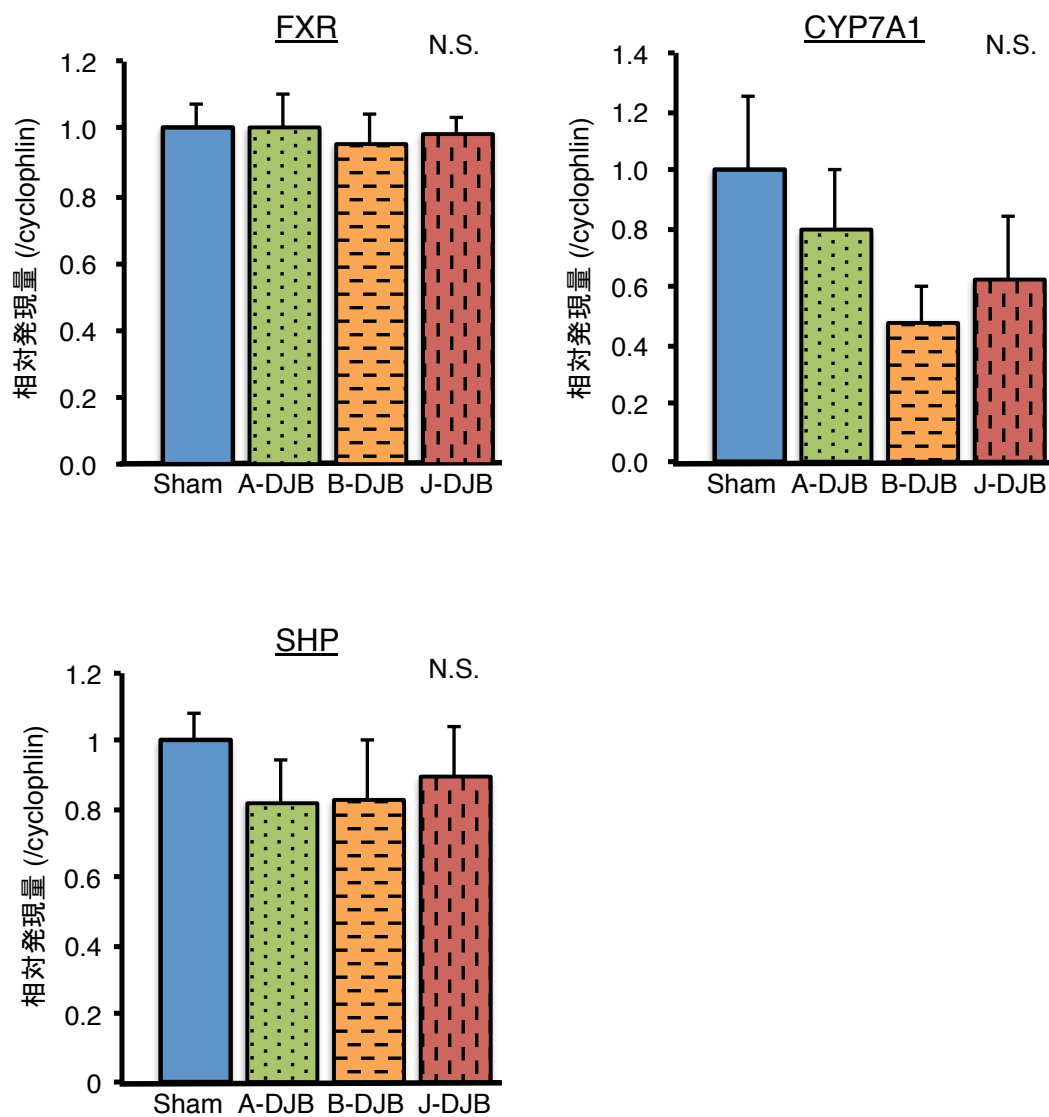


図16. 肝臓胆汁酸合成に関与する遺伝子発現。real-time PCR法によるmRNA発現定量。FXR = farnesoid X receptor、CYP7A1 = cytochrome P450 7A1、SHP = small heterodimer partner、n = 6、N.S. = not significant。

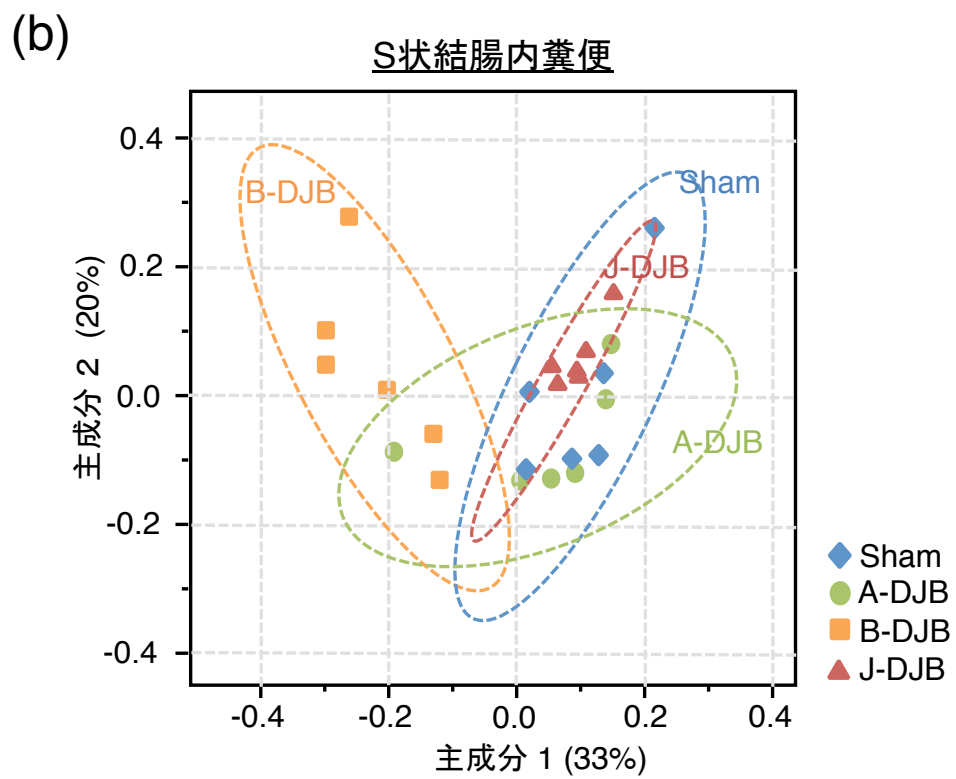
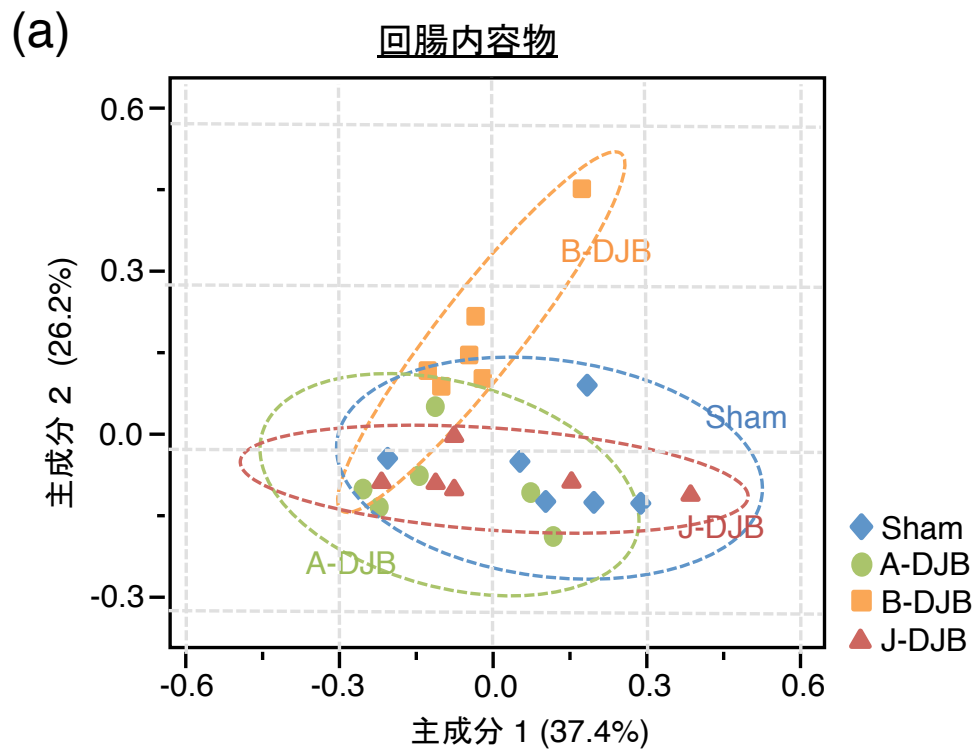


図17. (a)回腸内容と(b)S状結腸より採取した糞便の腸内細菌叢の主成分分析、n = 6。

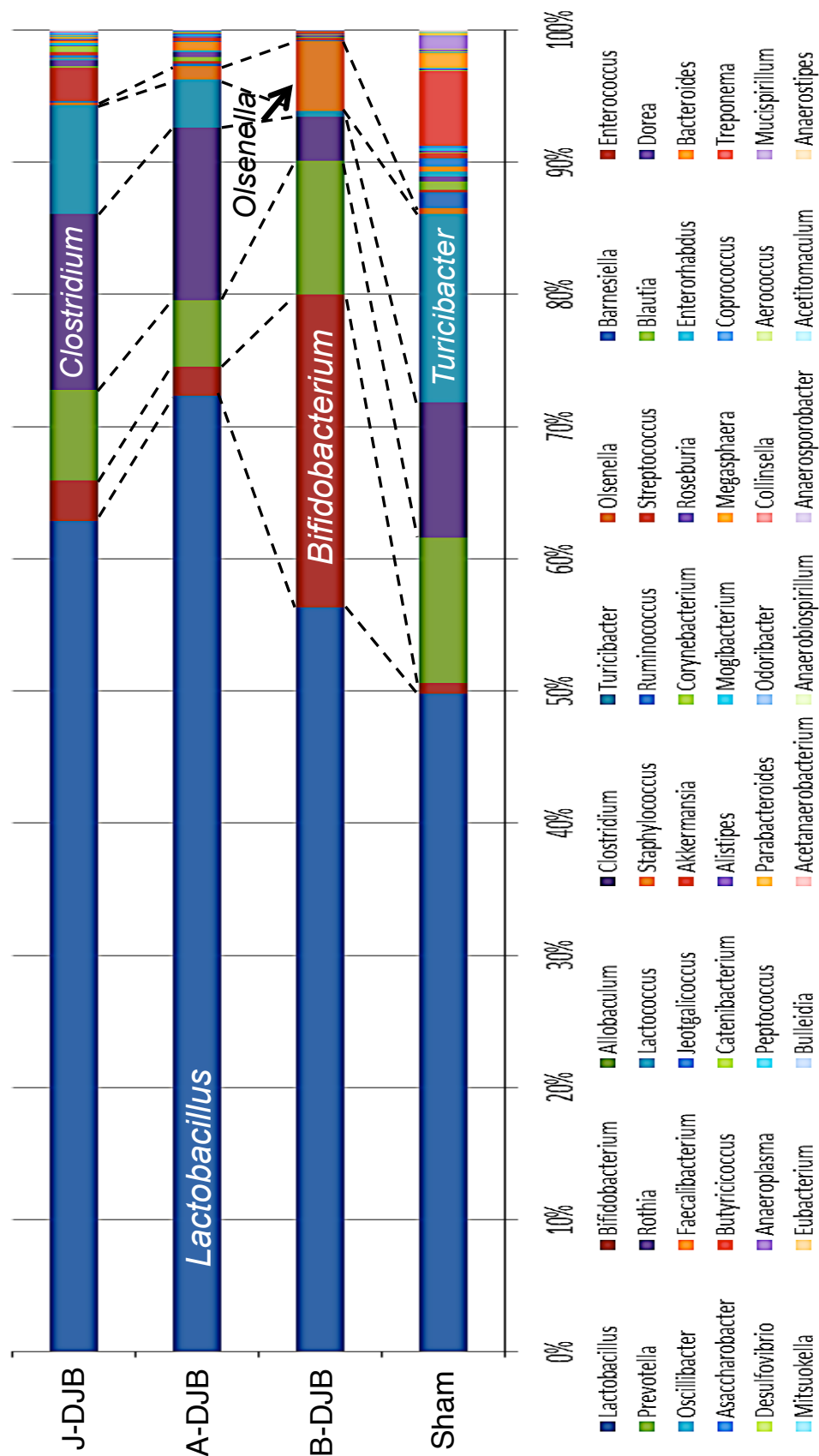


図18. 回腸内容の腸内細菌叢構成比較(属) 、 n = 6。

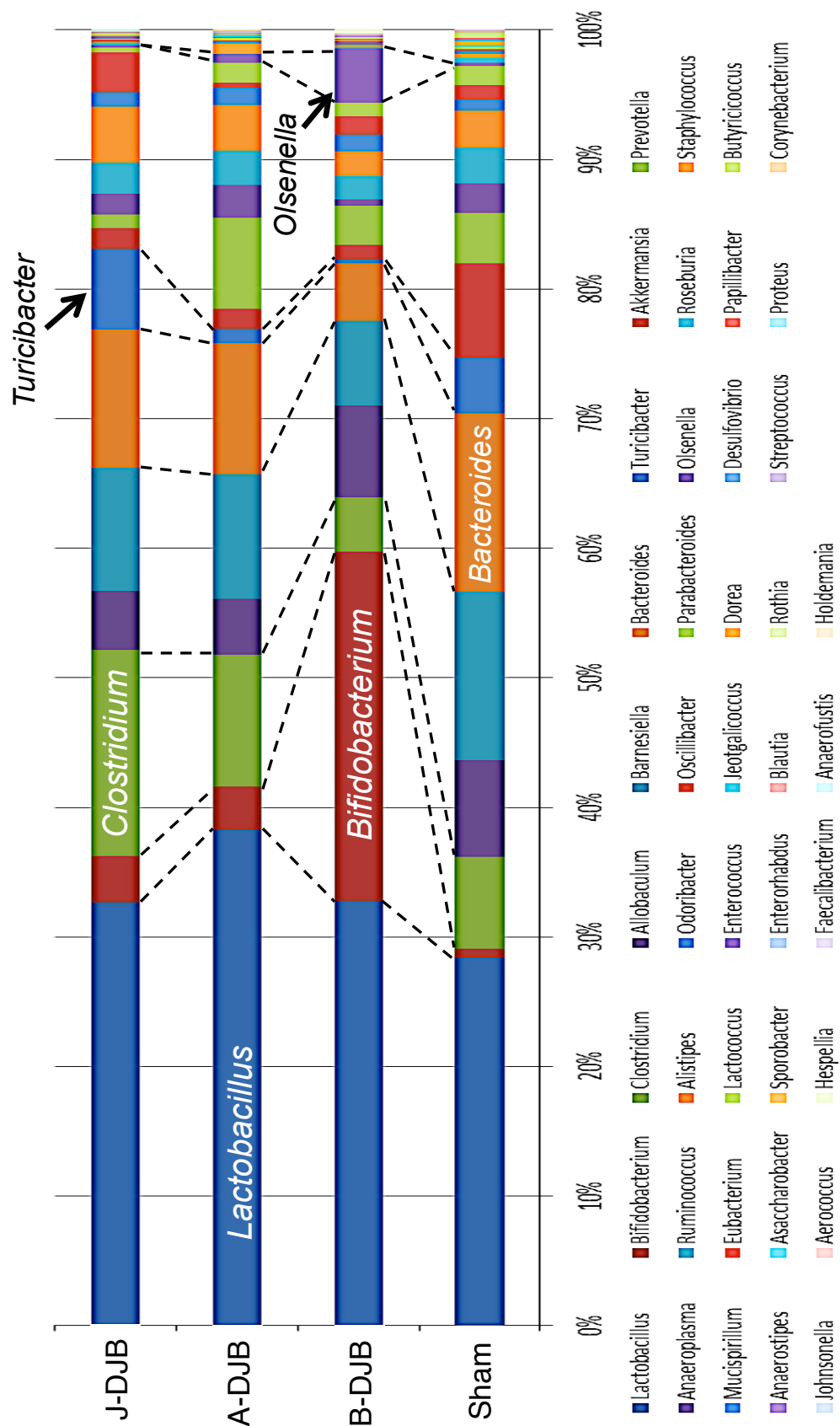


図19. S状結腸より採取した糞便の腸内細菌叢構成比較(属) 、 n = 6。

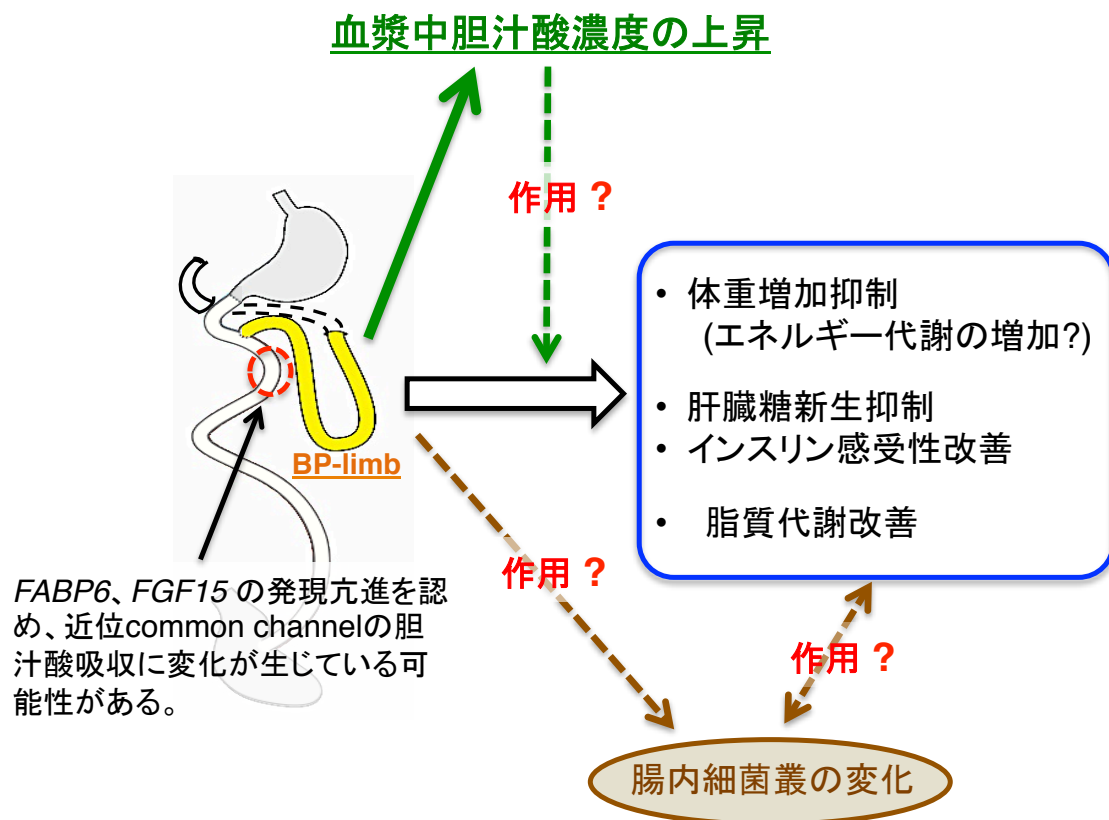
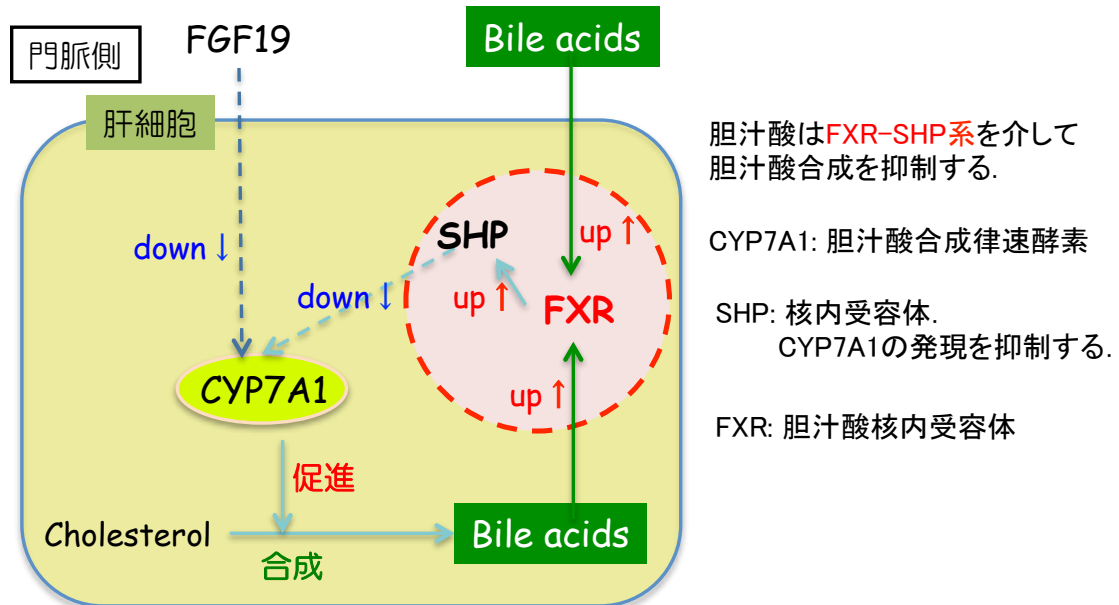


図20. 本研究から推測されるbilio-pancreatic limbの作用

(a)



※ この他にも胆汁酸合成を厳密に制御する多重のフィードバック機構が存在する。

(b)

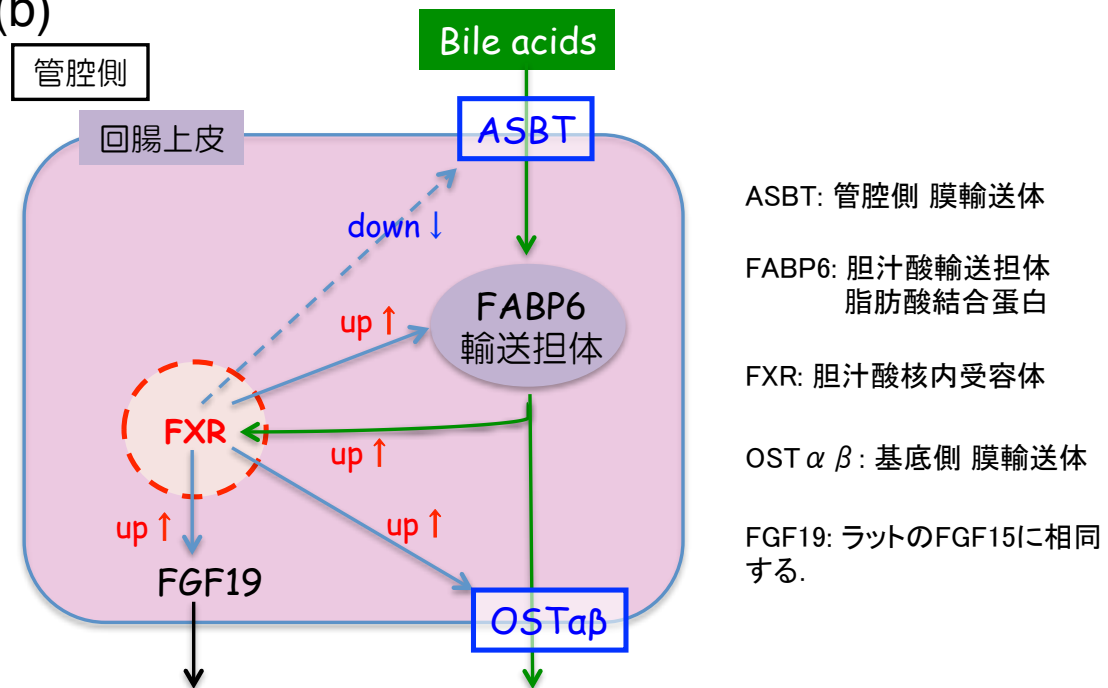


図21. (a) 肝細胞における胆汁酸合成。(b) 回腸上皮の胆汁酸吸収。
FGF19 = fibroblast growth factor 19、CYP7a1 = cytochrome P450 7A1、
SHP = small heterodimer partner、FXR = farnesoid X receptor、ASBT =
apical sodium-dependent bile salt transporter、FABP6 = fatty acid binding
protein 6、OSTαβ = organic solute transporter αβ

X. 表

表 1. 定量 PCR に使用したプライマー配列

Gene	Forward	Reverse
<i>cyclophilin A</i>	TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG	CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC
<i>FGF15</i>	TTCAGGGAGGAAATGGACTG	CGTCCGTGGATTCAAAGAAA
<i>FABP6</i>	CCTTCACCGGCAAATACGA	CGTCCCCTTTCAATCACATCT
<i>ASBT</i>	GGTTGCGCTTGTTATTCCTGT	GGTTCAATGATCCAGGCACTT
<i>OSTα</i>	CCCTCATACTTACCAGGAAGAAGCTAC	CCATCAGGAATGAGAAACAGGC
<i>FXR</i>	CGCTGAGATGCTGATGTCTTG	CCTTCACTGCACATCCCAGAT
<i>CYP7A1</i>	CAGGGAGATGCTCTGTGTTCA	AGGCATACATCCCTTCCGTGA
<i>SHP</i>	ACCTGCAACAGGAGGCTCACT	TGGAAGCCATGAGGAGGATTC

FGF15 = fibroblast growth factor15、FABP6 = fatty acid binding protein6、ASBT = apical sodium-dependent bile salt transporter、OST = organic solute transporter、FXR = farnesoid X receptor、CYP7A1 = cytochrome P450 7A1、SHP = small heterodimer partner

表 2. 血漿メタボローム解析：各種胆汁酸 arbitrary unit 対 sham 群比

	Sham	A-DJB	B-DJB	J-DJB
CA	1 ±0.67	0.97 ±0.32	2.04 ±0.41	0.66 ±0.16
G-CA	1 ±0.35	0.91 ±0.28	3.27 ±1.03 *	0.55 ±0.25
T-CA	1 ±0.29	1.50 ±0.56	2.49 ±0.41 *	0.87 ±0.19
CDCA	1 ±0.22	1.17 ±0.43	3.03 ±0.51 *	0.87 ±0.15
G-CDCA	1 ±0.36	0.72 ±0.44	4.83 ±1.50 *	0.33 ±0.20
T-CDCA	1 ±0.28	1.32 ±0.71	3.31 ±0.53 *	0.84 ±0.12
DCA	1 ±0.14	1.22 ±0.21	2.12 ±0.54	1.14 ±0.15
G-DCA	1 ±0.17	1.14 ±0.51	2.44 ±0.31 **	0.76 ±0.19
T-DCA	1 ±0.41	3.76 ±3.28	1.45 ±1.28	2.43 ±0.47
UDCA	1 ±0.24	1.47 ±0.21	3.01 ±0.36 ***	1.08 ±0.16
T-UDCA	1 ±0.68	3.39 ±3.90	8.57 ±3.42 *	0 ±0
HDCA	1 ±0.67	1.92 ±1.02	6.96 ±0.30 ***	1.61 ±0.75

CA = コール酸、CDCA = ケノデオキシコール酸、DCA = デオキシコール酸、UDCA = ウルソデオキシコール酸、HDCA = ヒオデオキシコール酸、G- = グリシン抱合、T- = タウリン抱合、* , ** , *** = $P < 0.05, 0.01, 0.001$ 対 sham 群、Dunnett's test。リトコール酸とグリシン抱合ウルソデオキシコール酸は sham 群が検出域外であったため、記載していない。B-DJB 群が軒並み高値となり、その多くで sham 群との間に有意差がついた。